



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RODRIGO AUGUSTO FRANCO DE OLIVEIRA ZAWADZKI

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO CONTÍNUO DE PRÉ-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DE EFLUENTE COM ELEVADO TEOR LIPÍDICO

CURITIBA

2011

RODRIGO AUGUSTO FRANCO DE OLIVEIRA ZAWADZKI

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSO CONTÍNUO DE PRÉ-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DE EFLUENTE COM ELEVADO TEOR LIPÍDICO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Química, Área de Concentração em Química Orgânica, Departamento de Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Nádia Krieger

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Real Prado
(UTFPR)

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Áquila Zbigniew Zawadzki e Thelma Regina Franco de Oliveira Zawadzki, por todo o esforço e investimento despendido com a minha educação, desde minha infância, adolescência até os dias hoje.

Ao meu irmão, Felipe Luís Franco de Oliveira Zawadzki, e meu tio, Salustiano Francisco de Oliveira, por sempre estarem por perto e completarem a nossa pequena família.

Aos meus avós Adherbal Francisco de Oliveira (*in memorian*) e Leonor Franco de Oliveira (*in memorian*), que fazem muita falta para toda a família.

Aos meus amigos, os “guerreiros”, sempre com o apoio moral, com os momentos de descontração, facilitando encarar o dia-a-dia.

Aos colegas de trabalho do SENAI CIC e do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, pela ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Meio Ambiente do SENAI CIC, a coordenadora do laboratório Rosângela Mitiyo Handa, pelas análises físico-químicas sem custo, e ao gerente da unidade, Alaer Cardoso Júnior, pela liberação de horas de trabalho para o desenvolvimento desta pesquisa.

À indústria frigorífica que cedeu o efluente para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus orientadores Nádia Krieger e Marcelo Real Prado, por serem excelentes professores e acreditarem no meu potencial.

Ao Professor David Alexander Mitchell, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo auxílio e revisão do artigo submetido.

EPÍGRAFE

“...A civilização é apenas uma das extraordinárias proliferações naturais que depende do influxo constante da energia concentrada. Se a civilização se tornasse um sistema fechado, pela sua incapacidade de obter e armazenar uma quantidade suficiente de energia de alta utilidade, ela logo se tornaria desordenada... Uma civilização altamente entrópica caracteriza-se por energia degradada, maquinaria enferrujada, encanamentos podres e solos erodidos. Isto se parece com sua cidade?...”

Eugène P. Odum

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um processo contínuo de pré-hidrólise enzimática para o tratamento de um efluente com elevado teor lipídico. O efluente utilizado foi obtido de uma indústria frigorífica do município de São José dos Pinhais, PR. O sólido fermentado com atividade lipolítica utilizado para a pré-hidrólise dos lipídeos deste efluente foi produzido por fermentação no estado sólido, utilizando o fungo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM. O processo de pré-hidrólise foi realizado em um biorreator de leito fixo, preenchido com o sólido fermentado e alimentado com o efluente em fluxo ascendente. Um teste controle também foi realizado da mesma forma, porém, o sólido utilizado para preencher o biorreator neste teste não foi fermentado por *R. microsporus*. Os resultados mostraram que o tratamento enzimático em biorreator de leito fixo foi capaz de reduzir o teor de óleos e graxas (O&G) do efluente, onde foi observada uma eficiência entre 90% e 96% frente a 76% e 79% no controle. A redução do teor de O&G teve como consequência o aumento na biodegradabilidade do efluente, já que houve um acréscimo na razão DBO/DQO de 0,19 no efluente bruto para 0,55 no efluente tratado com 24 h de retenção no biorreator. A análise microbiológica do sólido fermentado contido no biorreator, após 101 dias de experimentos, revelou que o fungo encontrava-se viável, não tendo crescido praticamente nenhum outro microrganismo proveniente do efluente, mostrando que os resultados obtidos de remoção de O&G podem ser atribuídos à produção de lipases pelo microrganismo originalmente presente no sólido fermentado.

ABSTRACT

The goal of this dissertation is the development of a continuous enzymatic pre hydrolysis process for the treatment of a high fat wastewater. The waste used was obtained from a frigorific industry located in São José dos Pinhais (Paraná State, Brazil) and the lipase was produced by solid-state fermentation using *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM. The enzymatic pre hydrolysis was carried out in an aerobic column bioreactor that was filled with the solid fermented by *R. microsporus* and fed with the frigorific wastewater. A control test was also carried out at the same way, however, in this test the bioreactor was filled with the solid without fermentation by *R. microsporus*. The enzymatic treatment reduced the oil and grease (lipids) of the waste water by 90% to 96% against 76% to 79% in the control. This had the consequence of increasing the biodegradability of the wastewater by a BOD/COD ratio of 0.19 in the raw wastewater to 0.55 in the clarified effluent treat with a retention time of 24 hours in the bioreactor. After 101 days of feeding the wastewater through the bioreactor, a microbiological analysis of the fermented solid in the bioreactor shown that the fungal strain was still viable, and virtually no other microorganism has grown in the solid. This result confirms the hypothesis that the O&G removal achieved is due to the production of lipases by the microorganism originally present in the fermented solid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma da produção de embutidos e de produtos curados e defumados de carne.....	15
Figura 2 -	Fluxograma de tratamento dos resíduos da indústria frigorífica que cedeu o efluente para esta pesquisa.....	16
Figura 3 -	Sistema preliminar de tratamento de efluentes.....	18
Figura 4 -	Sistema primário de tratamento de efluentes.....	19
Figura 5 -	Transformação e dissipação da energia durante o metabolismo da glucose em pH 7.....	20
Figura 6 -	Floco biológico formado em sistema aeróbico de tratamento.....	22
Figura 7 -	Reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF).....	22
Figura 8 -	Sistemas de lodos ativados.....	23
Figura 9 -	Reação de desnitrificação.....	24
Figura 10 -	Lodo biológico desidratado aguardando destinação final.....	24
Figura 11 -	Sistemas de desinfecção.....	25
Figura 12 -	Material agregado proveniente da mistura de óleos, gorduras e partículas sólidas flotados em uma caixa de gordura convencional.....	27
Figura 13 -	Adsorção de lipídeos sobre os flocos biológicos em um sistema aeróbico de tratamento de efluentes.....	28
Figura 14 -	Cadeia transportadora de elétrons em célula eucariótica.....	29
Figura 15 -	Quebra da ligação éster de triacilglicerol catalisada por uma lipase.....	31
Figura 16 -	Representação de fitas da estrutura 3D da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	31
Figura 17 -	Coleta do efluente no sistema preliminar de tratamento da indústria frigorífica.....	41
Figura 18 -	Reação de oxidação da matéria orgânica pelo dicromato de potássio.....	42
Figura 19 -	Sistema de pré-hidrólise enzimática em biorreator de leito fixo com fluxo contínuo.....	46
Figura 20 -	Atividade de lipase do sólido fermentado contido no leito fixo do biorreator ao longo do tratamento de pré-hidrólise do efluente de frigorífico.....	52
Figura 21 -	Período de adaptação da biomassa nos experimentos com o sólido fermentado e no teste controle.....	54

Figura 22 -	Perfil de óleos e graxas (O&G) no clarificado do biorreator, nos experimentos com o sólido fermentado e no teste controle.....	55
Figura 23 -	Monitoramento da DQO e DBO do clarificado ao longo dos 101 dias de experimentos.....	56
Figura 24 -	Relação DBO/DQO no efluente clarificado do biorreator.....	59
Figura 25 -	Perfil da variação da concentração de óleos e graxas (O&G) no efluente clarificado do biorreator.....	61
Figura 26 -	Crescimento de <i>Rhizopus microsporus</i> após incubação por 5 dias a 30 °C de alíquota do sólido retirado do biorreator após 96 dias de tratamento do efluente.....	62
Figura 27 -	Microscopia óptica de <i>Rhizopus microsporus</i>	63
Figura 28 -	Crescimento de microrganismos endógenos do efluente bruto após incubação de 5 dias a 30 °C de alíquota do sólido retirado do biorreator.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentrações médias de óleos e graxas (O&G) em esgotos domésticos e em efluentes de processos industriais diversos.....	26
Tabela 2 -	Valores obtidos no dimensionamento do biorreator de leito fixo.....	45
Tabela 3 -	Caracterização físico-química do efluente de frigorífico utilizado neste estudo.....	50
Tabela 4 -	Variação da vazão de entrada no biorreator de leito fixo conforme tempo de retenção hidráulico.....	51
Tabela 5 -	Variação da eficiência do biorreator para cada tempo de retenção hidráulico.....	58
Tabela 6 -	Comparativo da característica e eficiência do tratamento enzimático de pré-hidrólise, de efluente de elevada concentração de O&G, realizado no presente trabalho com os realizados por outros grupos de pesquisa.....	68

LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABRAFIGO – Associação Brasileira de Frigoríficos
ADP – Adenosina Difosfato
ATP – Adenosina Trifosfato
CEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente
CIP – *Cleaning in Place*
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO – Demanda Química de Oxigênio
EC – *Enzyme Comission*
ETE – Estação de Tratamento de Esgoto
FAD – Flavina Adenina Dinucleotídio
FES – Fermentação no Estado Sólido
FS – Fermentação Submersa
GEFOR – *Grupo de Estudio para la Formación y docencia en enfermedades infecciosas y microbiologia*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídio
NBR – Norma Brasileira
O&G – Óleos e Graxas
OD – Oxigênio Dissolvido
PDA – Ágar Dextrose Batata
pH – Potencial Hidrogeniônico
PVC – Policloreto de Vinila
RALF – Reator Anaeróbico de Leito Fluidizado
SANEPAR – Companhia de Saneamento do Paraná
SENAI CIC – Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – Unidade Cidade Industrial de Curitiba
SSF – Sólidos Suspensos Fixos
SST – Sólidos Suspensos Totais
SSV – Sólidos Suspensos Voláteis
TRH – Tempo de Retenção Hidráulico
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. INDÚSTRIAS FRIGORÍFICAS	14
2.2. SISTEMAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES	17
2.2.1. Tratamento Preliminar.....	17
2.2.2. Tratamento Primário	18
2.2.3. Tratamento Secundário.....	19
2.2.4. Tratamento Terciário.....	25
2.3. EFLUENTES DE ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS.....	26
2.3.1. Caracterização dos Óleos e Graxas (O&G)	26
2.3.2. Problemas Ocasionalmente por Óleos e Graxas (O&G) em Efluentes.....	27
2.4. PRODUÇÃO DE LIPASES E SEU USO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES.....	30
2.4.1. Lipases	30
2.4.2. Processos de Produção de Lipases	33
2.4.3. Aplicação de Lipases no Tratamento de Efluentes.....	34
3. OBJETIVOS	38
3.1. OBJETIVO GERAL	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. MATERIAIS.....	39
4.2. METODOLOGIA.....	39
4.2.1. Produção do Inóculo e Manutenção do Microrganismo.....	39
4.2.2. Produção da Lipase por Fermentação no Estado Sólido.....	40
4.2.3. Determinação da Atividade de Lipase	40
4.2.4. Coleta e Caracterização do Efluente de Frigorífico	41
4.2.5. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)	42
4.2.6. Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	43
4.2.7. Determinação da Concentração de Óleos e Graxas (O&G)	43
4.2.8. Dimensionamento e Montagem do Biorreator	44
4.2.9. Tratamento de Pré-Hidrólise do Efluente de Frigorífico.....	46
4.2.10. Determinação da Atividade de Lipase e do Oxigênio Dissolvido (OD) no Biorreator.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. ATIVIDADE DE LIPASE DO SÓLIDO FERMENTADO	49
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE DE FRIGORÍFICO.....	49
5.3. TRATAMENTO DE PRÉ-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	51

5.3.1. Atividade de Lipase no Biorreator	52
5.3.2. Período de Adaptação da Biomassa no Biorreator.....	53
5.3.3. Eficiência na Remoção da DQO, DBO e Óleos e Graxas (O&G)	55
5.3.4. Identificação e Isolamento de <i>Rhizopus microsporus</i> ao final dos experimentos	61
5.4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	64
6. CONCLUSÕES	72
7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

A atual conjuntura mundial, onde a necessidade do cumprimento de padrões ambientais cada vez mais restritivos, seja quanto à qualidade das águas ou limites de emissões de efluentes, exige que os sistemas de tratamento atinjam maiores eficiências quanto à remoção de carga orgânica. Dentro deste aspecto, as tecnologias modernas para tratamento de efluentes desempenham um importante papel.

Neste âmbito, indústrias frigoríficas possuem um grande entrave ambiental inerente aos seus processos produtivos, a geração de efluentes com altos teores de óleos e materiais graxos, ou seja, lipídeos. Estes compostos dificultam o tratamento do efluente, principalmente as operações unitárias de natureza biológica, principais formas adotadas pela indústria para remoção da matéria orgânica do efluente.

Altas concentrações de óleos e graxos (O&G) ocasionam baixa biodegradabilidade nos efluentes, visto que tais substâncias inibem o metabolismo microbológico. A baixa solubilidade do O&G em água também é responsável por problemas adicionais nas estações de tratamento, tais como entupimento de tubulações e colmatação de reatores (Camarota & Freire, 2006, Pereira et al., 2003; Vidal et al., 2000).

Uma das tecnologias modernas para tratamento de efluentes que vem mostrando-se cada vez mais promissora é a tecnologia enzimática. Para tanto, tais processo utilizam enzimas comerciais ou preparados enzimáticos para remover de forma específica um determinado poluente. Porém, a aplicação desta tecnologia em larga escala ainda está intimamente ligada ao seu custo de implantação e de operação, já que o uso de enzimas comerciais para este fim vem mostrando-se inviável às indústrias, e a produção de enzimas por fermentação submersa (FS) exige processos de extração e purificação de enzimas que também são custosos (Li & Zong, 2010). No entanto, a produção de enzimas por fermentação no estado sólido (FES), utilizando resíduos agroindustriais como substratos, mostra-se economicamente mais vantajosa, em torno de 30% mais barata segundo Alberton *et al.* (2010). Além disso, a técnica da FES permite o uso direto do sólido fermentado no tratamento de um efluente (sem a necessidade de extração ou purificação da enzima), tornando o processo economicamente atraente para as indústrias.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um processo contínuo de pré-hidrólise enzimática de um efluente de frigorífico (com teor de O&G de aprox. 600 mg.L^{-1}). Para isto, foi construído um biorreator de leito fixo, de fluxo ascendente e preenchido com o sólido fermentado com atividade lipolítica utilizando o fungo *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INDÚSTRIAS FRIGORÍFICAS

Segundo o Catálogo das Indústrias (2010), o ramo das indústrias alimentícias, no ano de 2010, obteve uma alta participação nas vendas das indústrias de transformação no estado do Paraná, com 28,31% do total de vendas, o que lhe cedeu o primeiro lugar nesta participação, 12,32% à frente das segundas colocadas, as indústrias de fabricação e montagem de veículos. Com 4402 estabelecimentos, a quantidade de trabalhadores empregados na indústria alimentícia também foi a maior dentre todas as atividades industriais de transformação no estado, com 151.239 trabalhadores (praticamente 26% do número total de trabalhadores nestas atividades) e 84.257 trabalhadores a mais que as indústrias de confecção de artigos e vestuários, segundas colocadas.

Segundo a Pesquisa Industrial Mensal de Produção Física (IBGE, 2010), houve um aumento na produtividade das indústrias alimentícias de 13,9% até setembro de 2010 em relação ao ano de 2009, terceiro maior entre as indústrias de bens de consumo semi e não duráveis. Quanto à indústria frigorífica, no período de janeiro a setembro de 2010 a exportação de produtos derivados de carne atingiu R\$ 3,69 bilhões, correspondentes à cerca de 983 mil toneladas de produtos. Deste montante, a participação do estado do Paraná corresponde a pouco mais de R\$ 56 milhões, referentes a 17,3 mil toneladas de produtos (ABRAFIGO, 2010).

Com base nestes dados, pode-se inferir que a indústria frigorífica possui um grande impacto no Brasil e no estado do Paraná. Tal impacto mostra-se tanto financeiro como econômico e ambiental, já que a atividade frigorífica apresenta uma alta geração de resíduos sólidos e efluentes. Estes resíduos são geralmente provindos dos processos de fracionamento da carne, etapas de pré-maturação e limpeza do maquinário industrial (Braile & Cavalcanti, 1993). Segundo Pardi *et al.* (2001) os resíduos em indústrias frigoríficas representam um problema sério, devido ao elevado volume, quantidade de gordura e teor de matéria orgânica no despejo líquido produzido. Além disso, os resíduos não tratados se comportam como focos de proliferação de insetos e agentes infecciosos.

A indústria frigorífica que cedeu seu efluente para a realização deste trabalho não possui matadouro em sua planta industrial, porém realiza a fabricação de embutidos (salames, salsichas, linguiças e mortadelas), cortes de carne suína, carnes temperadas e carnes defumadas. Dentre as formas de processamento da carne, aquelas que mais geram efluentes são as que apresentam etapas de cozimento (Madrid *et al.*, 1996).

Sendo assim, a Figura 1 ilustra os processos de produção de embutidos e carnes curadas e defumadas, principais geradores de águas residuais da indústria que forneceu o efluente para esta pesquisa.

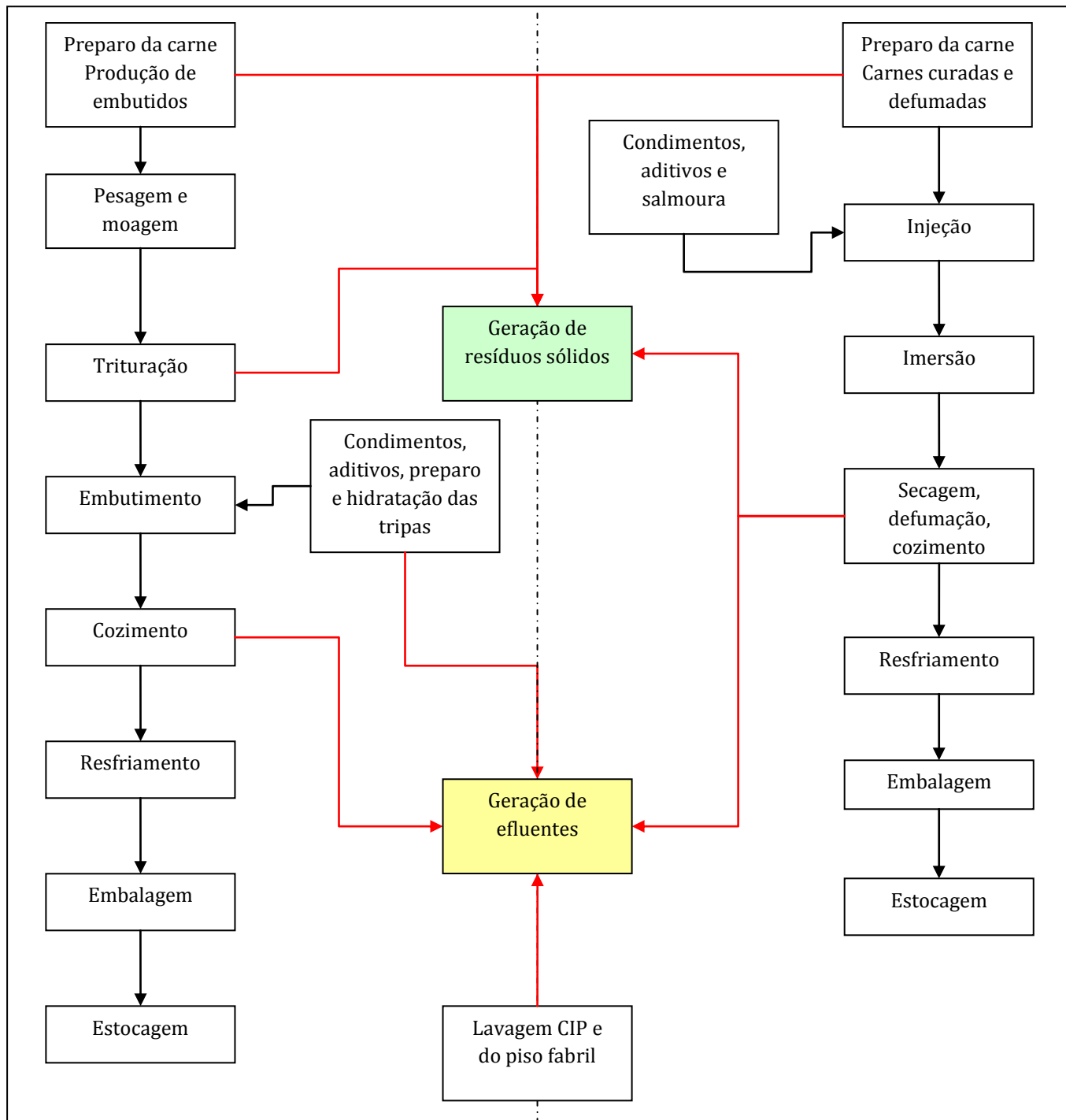


Figura 1. Fluxograma da produção de embutidos e de produtos curados e defumados de carne. Adaptado de: Guia para elaboração do Plano APPCC (1999).

Observa-se na Figura 1 que a geração de efluentes dá-se nas etapas finais dos processos produtivos, principalmente naquelas relacionadas ao cozimento do alimento. Há uma grande contribuição de efluentes pelos processos de higienização do pátio fabril

e da lavagem CIP (*cleaning in place*) dos maquinários onde os alimentos são preparados. A lavagem CIP consiste em realizar a sanitização de canalizações e equipamentos sem prévia desmontagem, e utiliza soluções para detergentes e desinfecção, principalmente com cloro livre (ClO^-) (PARDI et al., 2001).

A indústria que forneceu o efluente para esta pesquisa realiza a lavagem CIP e higienização do pátio fabril uma vez ao dia. A geração de efluentes, englobando o processo produtivo e os processos de higienização, soma $150 \text{ m}^3/\text{dia}$ e, considerando uma operação industrial de 16 h/dia, gera-se uma vazão média de $9,4 \text{ m}^3/\text{h}$ de efluente bruto. A Figura 2 mostra o fluxograma do sistema de tratamento dos efluentes gerados pela indústria, onde se observa que, após tratamento preliminar (peneiramento e caixa de gordura) o efluente segue para tratamento biológico por sistemas de lagoas.

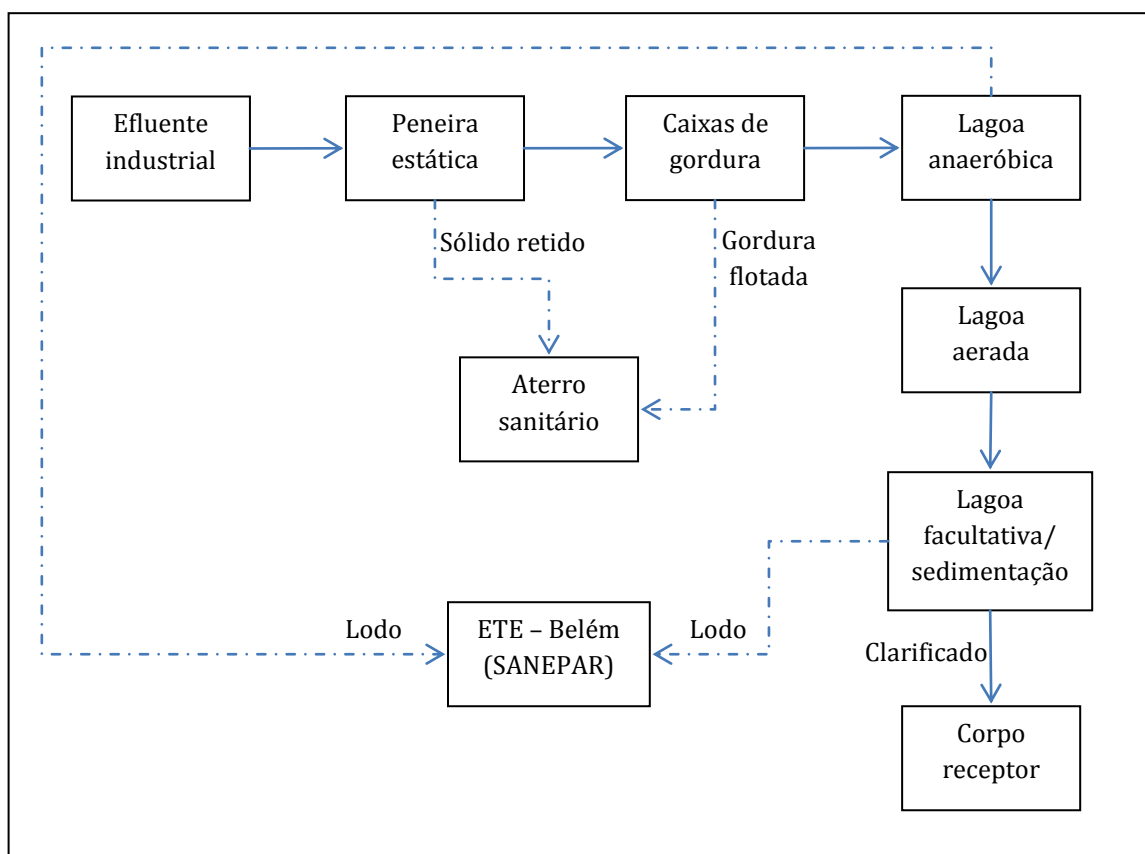


Figura 2. Fluxograma de tratamento dos resíduos da indústria frigorífica que cedeu o efluente para esta pesquisa.

Conforme Figura 2, os sólidos retidos na peneira, bem como a gordura flotada, são acondicionados em tambores plásticos e mensalmente destinados para aterro sanitário. O lodo sedimentado nas lagoas anaeróbicas e facultativa/sedimentação é removido, em média a cada 5 anos, por caminhões “limpa fossa” e destinado para a ETE – Belém (Estação de Tratamento de Esgoto) da SANEPAR (Companhia de Saneamento do Paraná).

Os sistemas de tratamento de efluentes serão discutidos no item 2.2, porém, pode-se afirmar que a tecnologia de tratamento adotada por esta indústria mostra-se ultrapassada, já que atualmente a grande maioria das indústrias utiliza processos biológicos por lodos ativados. Isto ocorre porque os sistemas de lagoas adequam-se pouco à característica crucial necessária a um sistema de tratamento biológico, que é “reproduzir em dispositivos racionalmente projetados, os fenômenos biológicos observados na natureza, condicionando-os em espaço e tempo economicamente justificáveis”. Lagoas de tratamento necessitam de áreas muito grandes, e, sua eficiência de tratamento quando comparada a um sistema de requisito de área bastante compacto, como lodos ativados (tecnologia mais utilizada para tratamento biológico em nível mundial), é cerca de 20% menor (Von Sperling, 2005). Além disso, o responsável pelo controle ambiental desta indústria relata a constante ocorrência de baixa eficiência na remoção da carga orgânica do efluente.

2.2. SISTEMAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

Os sistemas convencionais de tratamento de efluentes, normalmente adotados na indústria, são divididos em quatro níveis distintos, a saber, (VON SPERLING, 2005):

- Tratamento preliminar, cujo objetivo é a remoção de materiais sólidos grosseiros;
- Tratamento primário, objetivando a remoção da matéria orgânica através da redução no teor de SST (Sólidos Suspensos Totais), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio);
- Tratamento secundário, para a remoção da matéria orgânica solúvel (DQO e DBO solúvel);
- Tratamento terciário, cujo objetivo é remover microrganismos ou poluentes específicos do clarificado.

2.2.1. Tratamento Preliminar

As operações unitárias envolvidas no tratamento preliminar apresentam-se todas como mecanismos de remoção física, tais como gradeamento, desarenação (remoção de areia), remoção de óleos e graxas por flotação, medição de vazão e equalização (Metcalf & Eddy, 2003). A Figura 3 demonstra estes processos unitários.

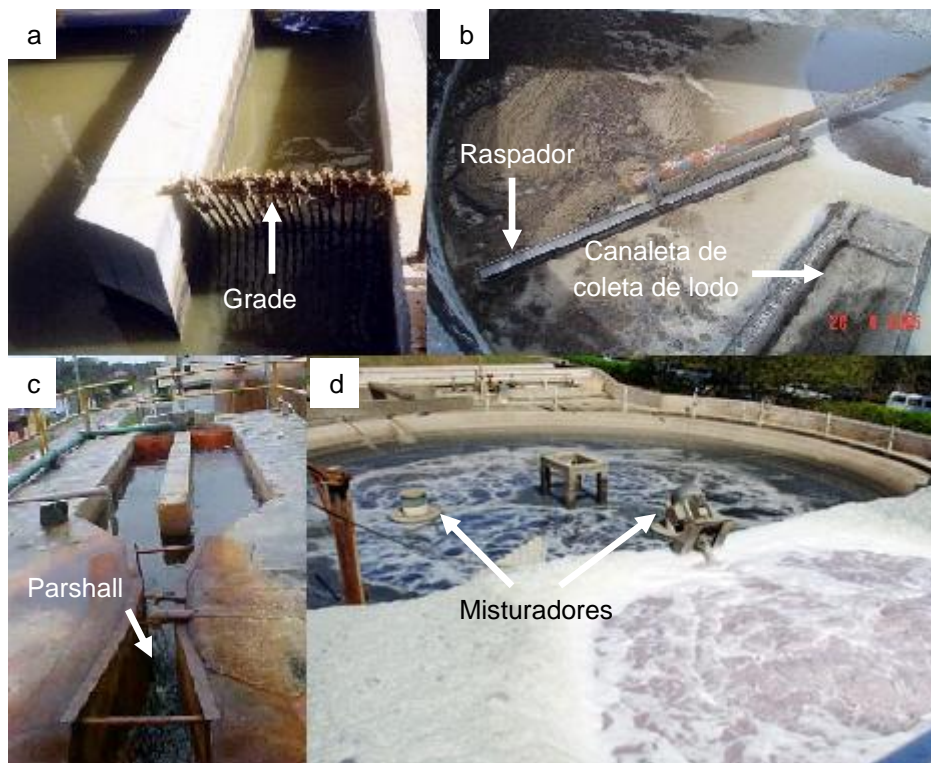


Figura 3. Sistema preliminar de tratamento de efluentes. a) Canal de aproximação com gradeamento. b) Flotador com raspador superficial de lodo. c) Desarenador com calha Parshall na saída. d) Bacia de equalização com misturadores de superfície. Fonte: SENAI CIC.

O tratamento preliminar consiste apenas em preparar o efluente para torná-lo passível de tratamento, através da remoção de materiais grosseiros como sólidos, fibras, areia, pedras e partículas de rápida flotação, conforme é observado na Figura 3. A medição de vazão e a equalização são geralmente as últimas etapas deste tratamento, sendo extremamente importantes para o dimensionamento e correta operação das unidades subsequentes de tratamento (JORDÃO & PESSÔA, 2005).

2.2.2. Tratamento Primário

O tratamento primário é constituído por processos físico-químicos, utilizando a coagulação e floculação de colóides, e empregando a decantação para separação do material suspenso formado (Eckenfelder, 1989). A coagulação é realizada através da dosagem de sais de ferro ou alumínio, principalmente cloreto férrico e sulfato de alumínio, que são capazes de desestabilizar o movimento Browniano dos colóides (que apresentam carga superficial negativa), promovendo agregação destas partículas. A floculação, que utiliza a dosagem de soluções de polímeros sintéticos, promove o aumento do tamanho das partículas através da adsorção de coágulos na longa estrutura

molecular do polímero (Di Bernardo, 2005). A Figura 4 mostra o processo de decantação aplicado para a posterior separação das fases formadas após a coagulação/floculação.

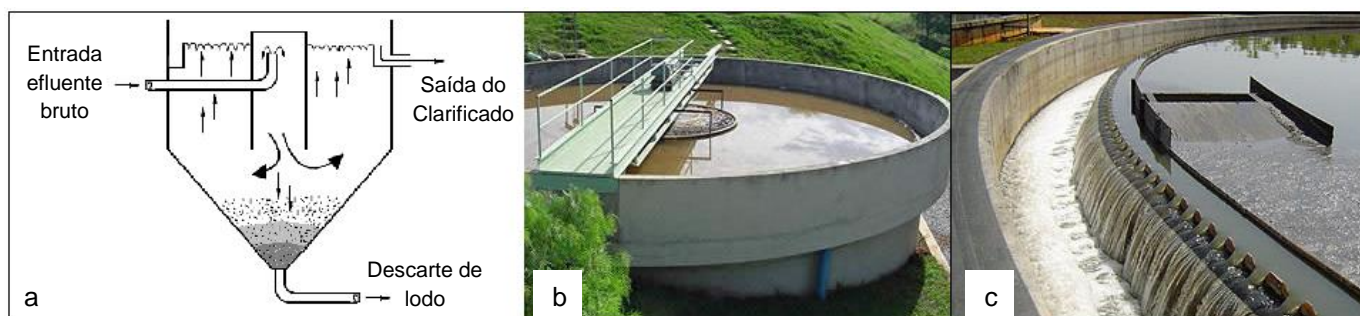


Figura 4. Sistema primário de tratamento de efluentes. a) Croqui ilustrativo de um decantador primário. b) Decantador primário semienterrado. c) Detalhe da canaleta de coleta do efluente clarificado. Fonte: SENAI CIC.

A decantação das partículas ocorre devido à diminuição na velocidade de fluxo dentro do decantador, promovendo a sedimentação dos flocos no fundo desta unidade, e, por consequência, separando as fases lodo e clarificado (Di Bernardo, 2005). O lodo segue para deságue e posterior destinação final, conforme classificação segundo ABNT NBR 10.004/2004. Já o clarificado, verte pela superfície do decantador através de uma canaleta de coleta, conforme é observado na Figura 4, seguindo para etapas subsequentes de tratamento, descarte ou reuso, dependendo da qualidade atingida no clarificado (JORDÃO & PESSÔA, 2005).

2.2.3. Tratamento Secundário

Os sistemas de tratamento secundário envolvem etapas biológicas de redução da carga orgânica, através da remoção da DBO solúvel por meio de reações metabólicas, executadas por microrganismos heterotróficos, aeróbicos, anaeróbicos ou facultativos, principalmente bactérias, fungos, rotíferos e protozoários. Estes microrganismos representam a biomassa do sistema de tratamento. Neste processo, a energia necessária para as funções vitais é obtida a partir de uma fonte de carbono (matéria orgânica presente no efluente), que fornece o substrato necessário à geração de ATP (adenosina trifosfato). O ATP é a forma básica de obtenção de energia livre de Gibbs para tais sínteses metabólicas. A Figura 5 relata a forma como ocorre a geração de ATP tanto em processos anaeróbicos como aeróbicos de tratamento (JÖRDENING e WINTER, 2005).

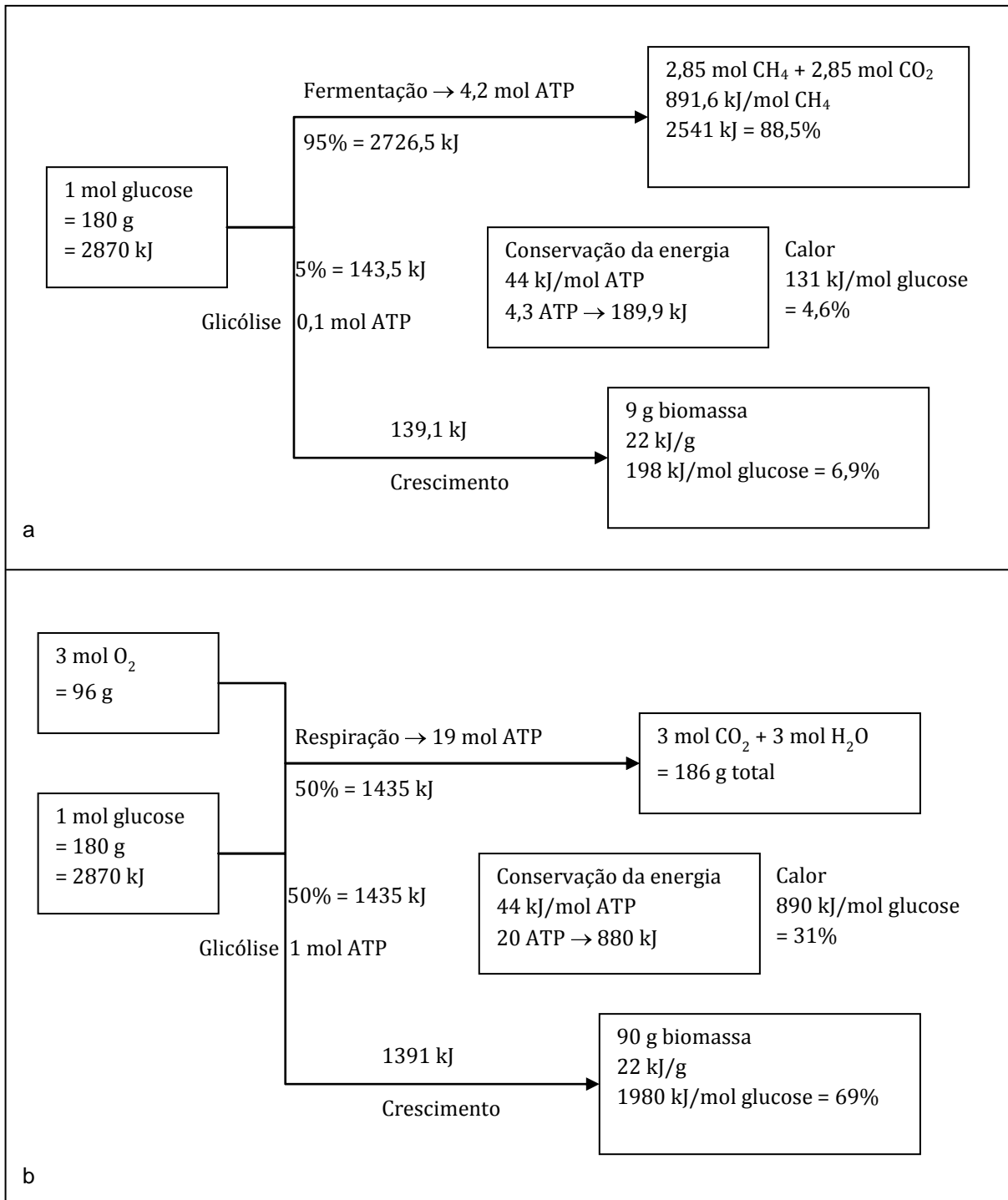


Figura 5. Transformação e dissipação da energia durante o metabolismo da glicose em pH 7. a) Processo anaeróbico. b) Processo aeróbico. Adaptado de Jördening e Winter (2005).

Observa-se na Figura 5 que os processos aeróbicos geram uma quantidade maior de ATP, ou seja, maior energia livre de Gibbs. Sendo assim, estes processos são mais eficientes para metabolizar substratos orgânicos, tais como os presentes em um efluente. Além disso, células aeróbicas são capazes de converter com maior eficiência a matéria orgânica em substrato para a formação de novas células (conversão 10 vezes maior), já que neste processo existe uma disponibilidade de 20 mols de ATP para manutenção das

funções vitais celulares, frente a apenas 4,3 mols de ATP para as mesmas funções em uma célula anaeróbica (Jördening e Winter, 2005). Esta grande diferença de energia também é explicada pelos diferentes aceptores finais de elétrons existentes em cada tipo de processo. Sob aerobiose, o principal acceptor é o oxigênio molecular (O_2), que recebe os elétrons transferidos ao longo da cadeia transportadora. Porém, sob anaerobiose, devido à baixa disponibilidade ou ausência de oxigênio molecular, tais aceptores são moléculas orgânicas simples, energeticamente menos favoráveis a formação de ATP, principalmente moléculas orgânicas simples (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1998).

Entretanto, devido à geração de metano, os processos anaeróbicos de tratamento apresentam uma vantagem frente aos aeróbicos – a possibilidade de exploração do potencial energético através da queima do gás gerado (METCALF & EDDY, 2003).

Sendo assim, para a ocorrência do abatimento da carga orgânica do efluente, os sistemas biológicos de tratamento dependem da formação de flocos biológicos (biomassa), que são definidos pela interação de partículas de matéria orgânica e microrganismos, seja de forma suspensa no meio líquido ou aderida a um meio suporte. A quantidade de biomassa ativa no lodo é medida em função do teor de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), e a biomassa morta representada pelo teor de Sólidos Suspensos Fixos (SSF) (Von Sperling, 1996). A Figura 6 mostra um floco biológico formado em um sistema aeróbico de tratamento. Nos sistemas de tratamento de efluentes os flocos biológicos são formados dentro de lagoas ou reatores (crescimento em suspensão) ou no leito de filtros (crescimento fixo). Dentre os sistemas de crescimento em suspensão, destacam-se como os mais utilizados nas indústrias os reatores anaeróbicos de leito fluidizado (RALF) e os sistemas de lodos ativados (mistura completa e valos de oxidação).

A Figura 7 mostra um sistema de RALF. Neste tipo de reator o efluente é alimentado em fluxo ascendente, onde sofre contato e mistura com o manto de lodo, ocorrendo o consumo da matéria orgânica, ocasionando a formação de biogás (mistura de CH_4 , CO_2 , N_2 e H_2S , entre outros). Devido à presença de um separador trifásico, o efluente clarificado verte pelas canaletas superiores, enquanto o manto de lodo permanece no fundo e o biogás é coletado e direcionado para queimadores (Grady *et al.*, 1999).

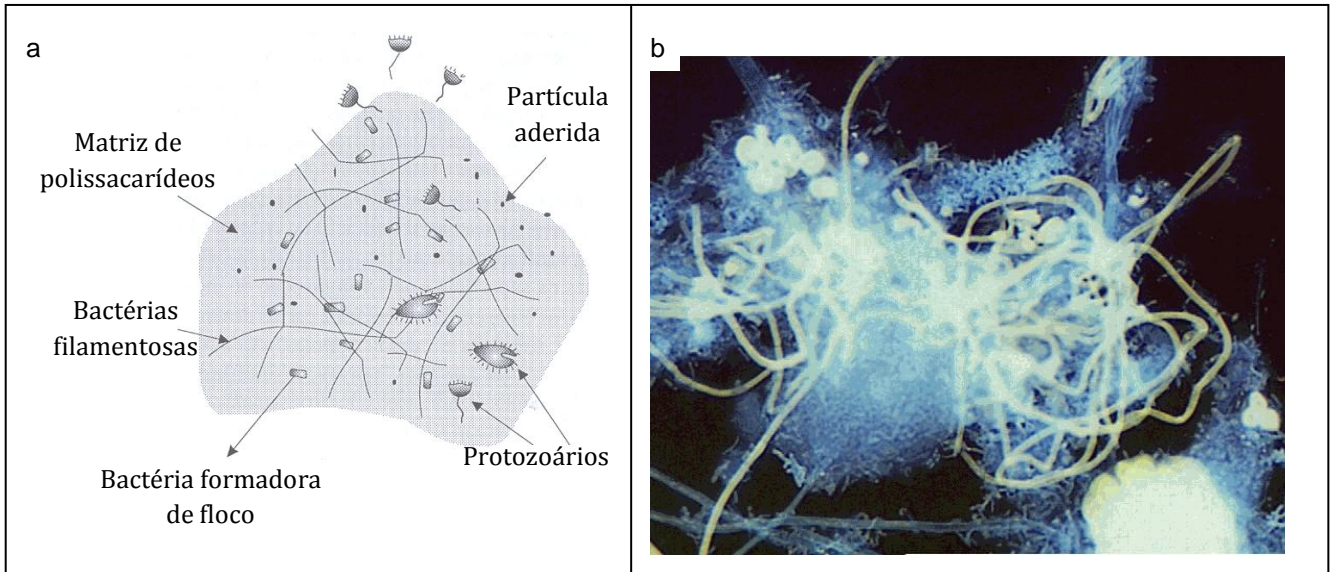


Figura 6. Floc biológico formado em sistema aeróbico de tratamento. a) Esquema demonstrando a interação entre microrganismos e matéria orgânica. b) Micrografia de flocos em um sistema de lodo ativado. Adaptado de Von Sperling (2005).

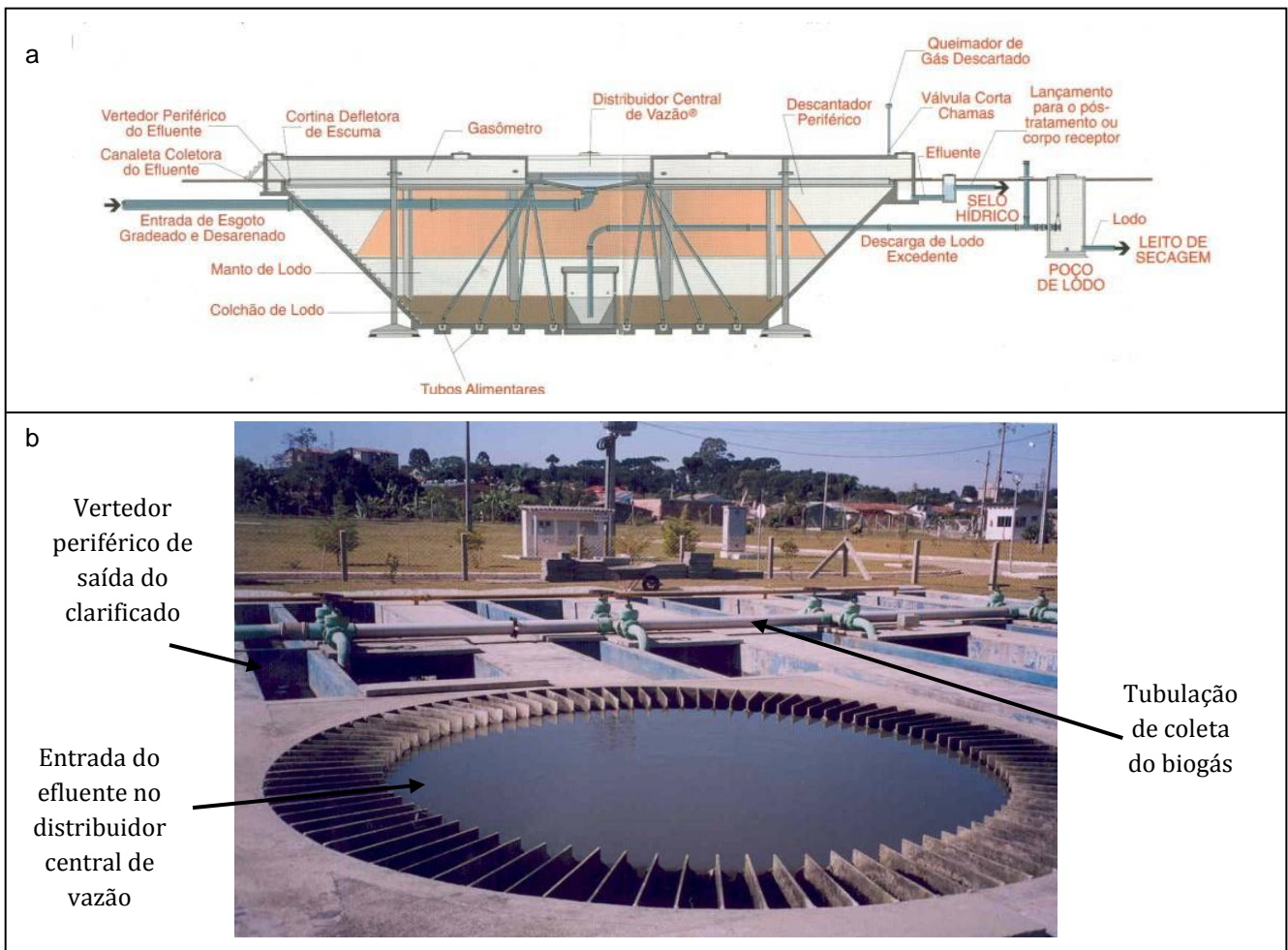


Figura 7. Reator anaeróbico de leito fluidizado (RALF). a) Croqui descritivo do reator. Fonte SANEPAR (2005). b) Unidade utilizada no tratamento de esgoto doméstico. Fonte: SENAI CIC.

Nos sistemas de lodos ativados o efluente é aerado em um reator, onde ocorre uma alta formação de flocos biológicos, que, como visto anteriormente, possui microrganismos que executam o abatimento da carga orgânica (Ramalho, 1983). Conforme é observado na Figura 8, esta suspensão de efluente e flocos é então transferida para um decantador secundário por desnível hidráulico ou bombeamento, onde os flocos sedimentam ao fundo formando um manto de lodo. Este lodo é então re-circulado, também por desnível hidráulico ou bombeamento, para o interior do reator aeróbico (Von Sperling, 2002).

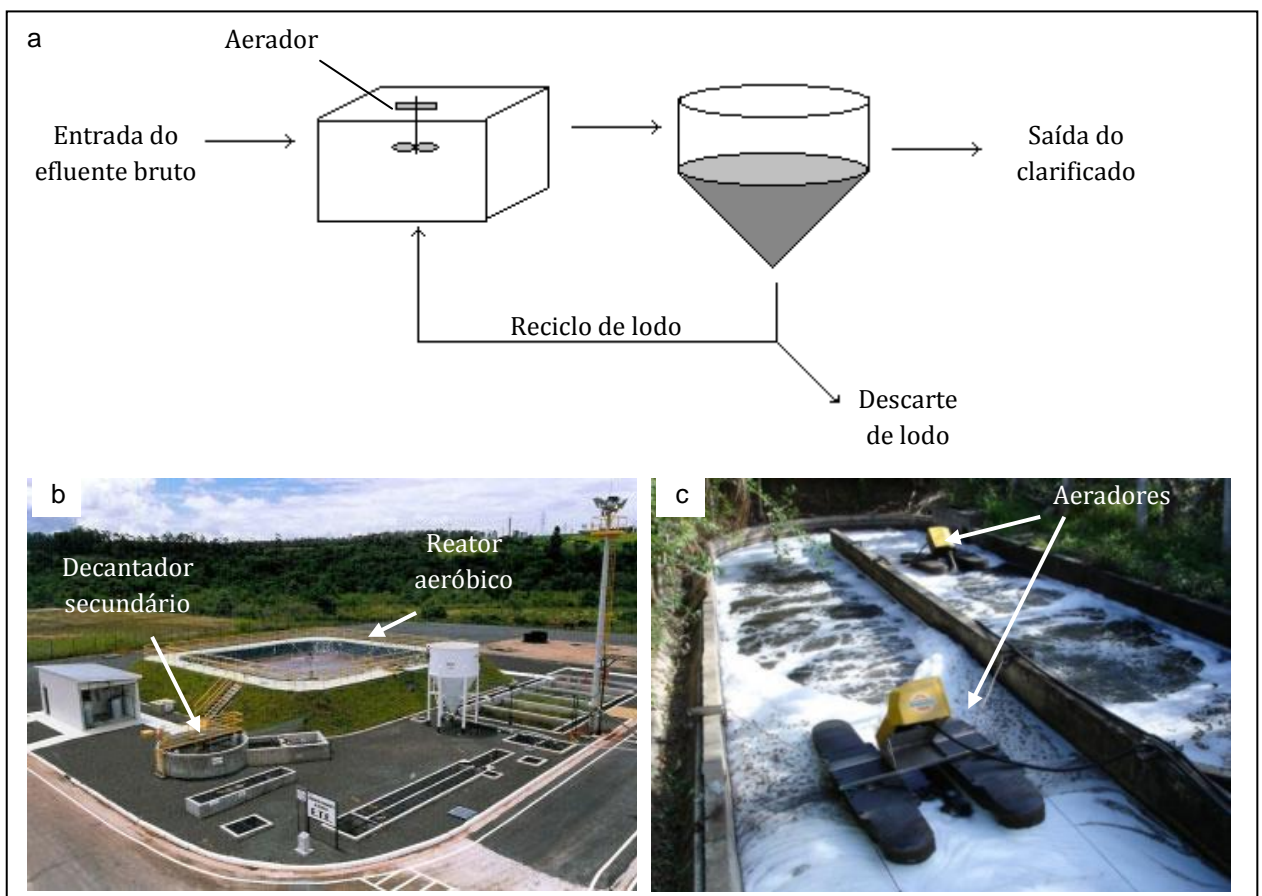


Figura 8. Sistemas de lodos ativados. a) Croqui descritivo do sistema. b) Sistema de lodos ativados de mistura completa. c) Sistema de lodos ativados em vala de oxidação. Fonte: SENAI CIC

Sistemas de lodos ativados são os mais eficientes entre todas as formas biológicas de tratamento. Isto ocorre devido à recirculação do lodo, que promove uma escassez de alimento no interior do reator, já que a quantidade de biomassa existente no reator é muito maior que a quantidade de alimento disponível (em torno de 0,08 a 0,80 g DBO.g SSV⁻¹). A escassez de alimento estimula a competição no reator, aumentando desta forma o metabolismo endógeno, e, por consequência, levando a um grande consumo de matéria orgânica (alta utilização de substrato). Desta forma, o

efluente clarificado adquire, desde que o sistema seja operado de forma ideal, valores de DBO tipicamente abaixo de 15 mg.L^{-1} , até mesmo quando tratando efluentes com DBO acima de 1000 mg.L^{-1} (Jordão & Pessoa, 2005, Von Sperling, 2002, Grady *et al.*, 1999 e Eckenfelder, 1989).

Os lodos ativados em valos de oxidação são sistemas utilizados para otimizar a remoção biológica de nitrogênio, já que, devido à sua conformação estrutural, a reação de desnitrificação em seu interior é facilitada. Este fenômeno ocorre devido ao afastamento dos aeradores, que ocasiona um decaimento acentuado no teor de OD (oxigênio dissolvido) ao longo do perfil do reator (Jordão & Pessoa, 2005). Desta forma, sob baixa concentração de OD, a reação de desnitrificação ocorre de forma mais apreciável, já que o seu equilíbrio é deslocado no sentido de formar gás nitrogênio, conforme mostrado na Figura 9 (Hamilton *et al.*, 2008).

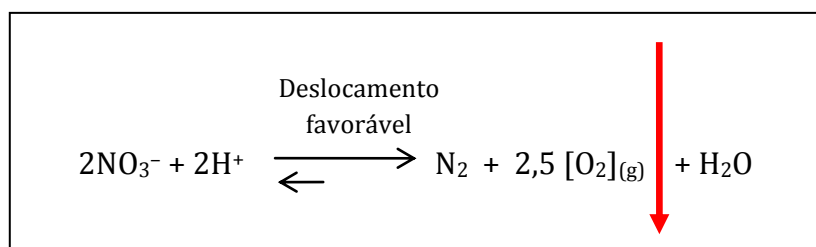


Figura 9. Reação de desnitrificação.

Devido à ocorrência de morte de biomassa no tratamento biológico, uma parte do lodo formado deve ser descartada periodicamente, visando à manutenção do equilíbrio entre SSV e SSF. Este lodo descartado ainda necessita de tratamento antes de sua destinação final e para tanto, as principais etapas compreendem a digestão, deságue e calagem (Von Sperling, 2005). A Figura 10 mostra o lodo biológico descartado já desidratado em um leito de secagem.



Figura 10. Lodo biológico desidratado aguardando destinação final. Fonte: SENAI CIC

2.2.4. Tratamento Terciário

Por fim, o tratamento terciário de efluentes visa dar polimento ao clarificado, e tem como principal representante a desinfecção. Neste processo, o clarificado sofre a eliminação seletiva de organismos patogênicos, tais como bactérias, protozoários, vírus e vermes, tanto por cloração ou irradiação UV (ultravioleta) (SANEPAR, 2005). A Figura 11 ilustra ambos os sistemas.

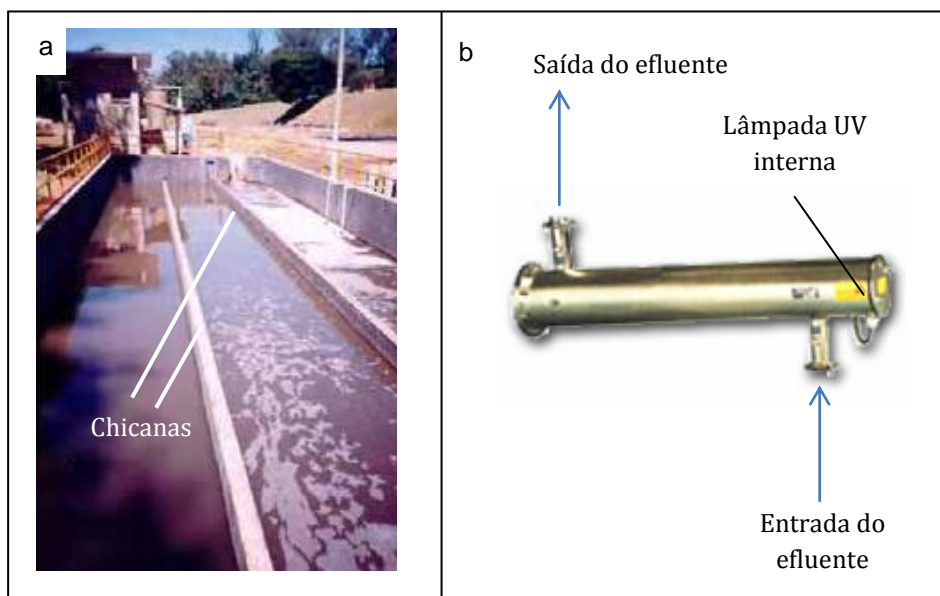


Figura 11. Sistemas de desinfecção. a) Cloração em câmara de contato. Fonte: SANEPAR (2005). b) Reator tubular para desinfecção por irradiação ultravioleta. Fonte: SENAI CIC.

Conforme Figura 11, as câmaras de contato para cloração consistem em forçar o fluxo do efluente através de um sistema de chicanas, fornecendo mistura lenta e tempo de retenção hidráulico mínimo de 30 minutos, ideal para que um teor de 0,2 a 0,5 mg $\text{ClO}^- \cdot \text{L}^{-1}$, forneça efeito germicida (SANEPAR, 2005). Já os reatores tubulares de desinfecção utilizam uma lâmpada UV que emite radiação em um comprimento de onda de 254 nm. Nestes reatores, dada à elevada quantidade de energia provinda da lâmpada, um tempo de retenção hidráulico de 1 a 2 minutos é suficiente para inativar microrganismos ou vírus (Hallmich & Gehr, 2010). Os sistemas de desinfecção UV mostram-se ambientalmente mais favoráveis frente à cloração, dada a não formação de organoalogenados. Porém, estes sistemas dependem de baixos teores de SST no efluente de entrada do reator, para que não ocorra perda de eficiência na desinfecção. Brahmi *et al.* (2010) obteve cerca de 50% de redução na transmitância da radiação UV durante a desinfecção de um efluente com teores de SST de aproximadamente 30 mg.L⁻¹.

2.3. EFLUENTES DE ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE ÓLEOS E GRAXAS

2.3.1. Caracterização dos Óleos e Graxas (O&G)

Óleos e graxas contidos em efluentes podem ser caracterizados pela fração de lipídeos, que se apresentam principalmente na forma de triacilgliceróis e ácidos graxos de cadeia longa. Em efluentes tais compostos são constituídos aproximadamente de 80% de ácido palmítico, esteárico, linoleico e oleico, sendo este último o mais abundante (MENDES *et al.*, 2005 *apud* QUÉMÉNIER *et al.*, 1991).

A Tabela 1 demonstra as concentrações de O&G em alguns tipos distintos de efluentes e mostra que os provenientes de indústrias alimentícias apresentam os mais elevados teores de O&G, podendo alcançar 16000 mg.L⁻¹ para o caso da indústria de produção de azeite de oliva.

Tabela 1. Concentrações médias de óleos e graxas (O&G) em esgotos domésticos e em efluentes de processos industriais diversos.

Tipo de efluente	Concentração de O&G
Esgotos domésticos ⁽¹⁾	50 a 100 mg.L ⁻¹
Refinarias ⁽²⁾	23 a 200 mg.L ⁻¹
Fabricação de Nylon ⁽²⁾	152 a 367 mg.L ⁻¹
Produção de oleofinas ⁽²⁾	10 a 300 mg.L ⁻¹
Frigoríficos ⁽²⁾	300 a 1000 mg.L ⁻¹
Produção de azeite de oliva ⁽³⁾	Em média 16.000 mg.L ⁻¹
Abatedouro de aves ⁽⁴⁾	Acima de 500 mg.L ⁻¹
Laticínios ⁽⁵⁾	Em média 4680 mg.L ⁻¹

(1) JORDÃO & PESSOA, 2005. (2) BRAILE & CAVALCANTI, 1993. (3) MENDES *et al.*, 2005 *apud* DE FELICE *et al.*, 1997. (4) MENDES *et al.*, 2005 *apud* PETRUY *et al.*, 1997. (5) MENDES *et al.*, 2005 *apud* MENDES *et al.*, 2004

A maior parte dos esforços despendidos para a remoção de O&G, em sistemas de tratamento de efluentes, consiste no tratamento preliminar (caixas de gordura e/ou flotores). Porém, estas unidades removem prioritariamente a fração de O&G livre (partículas grandes que flutam rapidamente à superfície). As frações que permanecem na forma solubilizada ou em dispersão mecânica (partículas pequenas de difícil flotação) são carregadas para as etapas subsequentes de tratamento, trazendo problemas operacionais.

2.3.2. Problemas Ocasionados por Óleos e Graxas (O&G) em Efluentes

Os problemas advindos da presença de concentrações elevadas de O&G, em efluentes, iniciam-se com a intensa formação de material pastoso, produto da agregação de partículas em suspensão misturadas com lipídeos. Este agregado ocasiona a obstrução de coletores, aderência nas paredes das unidades de tratamento, odores indesejáveis e perturbação no funcionamento dos dispositivos de tratamento (Jordão & Pessoa, 2005). A Figura 12 ilustra a formação destes agregados em uma caixa de gordura convencional.



Figura 12. Material agregado proveniente da mistura de óleos, gorduras e partículas sólidas flutuando em uma caixa de gordura convencional. Fonte: SENAI CIC.

Além disso, altos níveis de O&G, geralmente acima de 150 mg.L^{-1} , podem prejudicar o desempenho do processo biológico, levando à má formação de flocos, baixa sedimentabilidade do lodo e inibição do metabolismo microbiano (CAMMAROTA & FREIRE, 2006; PEREIRA *et al.*, 2003; VIDAL *et al.*, 2000).

O efeito recalcitrante dos lipídeos deve-se à adsorção na superfície das células dos microrganismos, ocasionando a inibição da atividade microbiológica por dificultar a difusão do oxigênio dissolvido para o interior da célula, conforme mostrado na Figura 13.

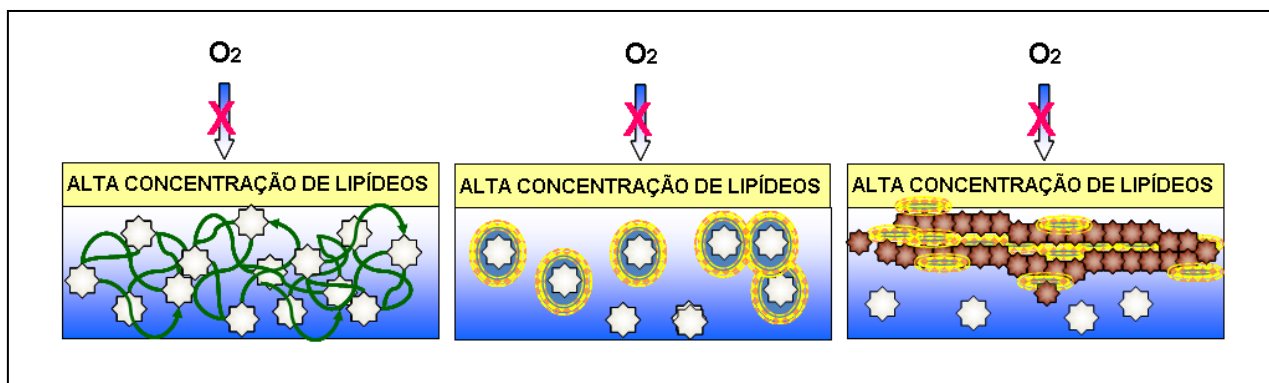


Figura 13. Adsorção de lipídeos sobre os flocos biológicos em um sistema aeróbico de tratamento de efluentes. Fonte: Adaptado de Donkin (1997).

Esta adsorção deve-se à característica da membrana celular, que é lipídica (lipoprotéica), ocasionando uma interação favorável entre moléculas de polaridades semelhantes (Hwu *et al.*, 1998 *apud* Galbraith & Miller, 1973 e Donkin, 1997). Entre outras consequências, segundo Donkin (1997), este fenômeno é responsável pela proliferação desordenada de bactérias filamentosas (*bulking* filamentoso), causando baixa sedimentabilidade do lodo nas unidades de decantação secundária, sendo desta forma arrastado com o efluente clarificado, deteriorando sua qualidade. Este crescimento desordenado está relacionado à baixa difusão de oxigênio para o interior das células microbianas, como mostra a Figura 13, já que bactérias filamentosas são capazes de sobreviver sob menor disponibilidade de oxigênio (Von Sperling, 2002).

Além de favorecer a ocorrência de *bulking* filamentoso, a diminuição na disponibilidade de oxigênio inibe processos metabólicos diretamente relacionados à geração de ATP nas células. Segundo Stephanopoulos *et al.* (1998), a principal rota metabólica relacionada a esta produção de energia é a cadeia de fosforilação, conforme mostrado na Figura 14. A cadeia de fosforilação, que ocorre nas mitocôndrias ou na membrana das células, consiste em transportar elétrons de vários complexos enzimáticos até um acceptor final, principalmente via NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), FAD (flavina adenina dinucleotídeo) e complexos de citocromo. Inicialmente, elétrons do NADH são doados para o complexo I, que é a enzima NADH desidrogenase. Elétrons do succinato são transferidos ao FAD, que está integrado ao complexo II (succinato desidrogenase). Os elétrons dos complexos I e II são então transferidos à ubiquinona, que se difunde livremente através das membranas lipídicas. Através da ubiquinona, os elétrons entram em um sistema de citocromos, inicialmente localizado no complexo III, que consiste nos citocromos *b566*, *b562* e *c1*. Via citocromo *c1*, os elétrons são transferidos ao complexo IV, uma citocromo oxidase, que finalmente deposita os elétrons no oxigênio molecular (acceptor final). Os complexos I, III e IV expandem a membrana mitocondrial interna, e, quando isto acontece, prótons são exportados em direção a

lacuna entre as membranas (via difusão livre). Via ATP-sintase (ATPase), prótons são reimportados para dentro da matriz mitocondrial (devido à diminuição do pH ocasionada pelo aumento na concentração de íons H^+ na lacuna entre as membranas). Quando três prótons são transferidos por este processo, uma unidade de ATP é formada pela conversão de ADP (STEPHANOPOULUS *et al.* 1998).

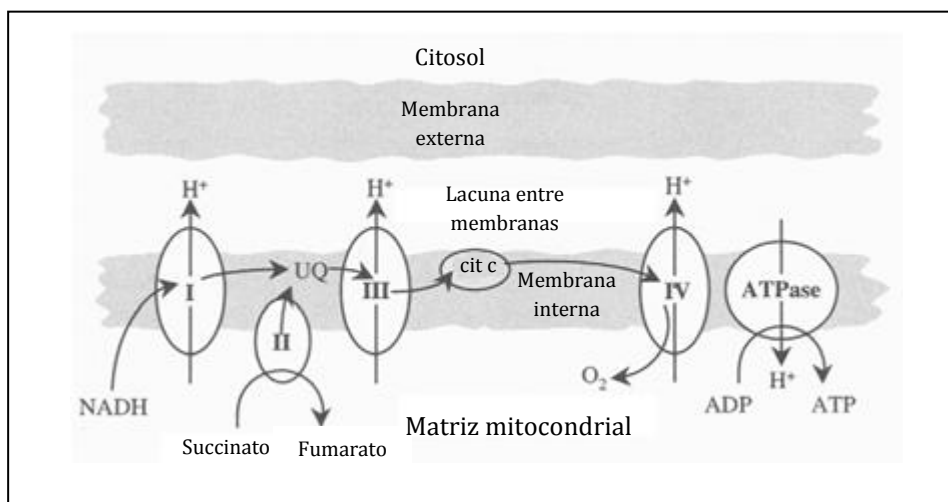


Figura 14. Cadeia transportadora de elétrons em célula eucariótica. I – NADH desidrogenase, II – succinato desidrogenase, III – citocromo *b566*, *b562* e *c1*, IV – citocromo oxidase. Fonte: Adaptado de Stephanopoulos *et al.* (1998).

Porém, sob baixa disponibilidade de oxigênio, a citocromo oxidase não é capaz de transferir de forma apreciável seus elétrons para o aceptor final, não ocorrendo os processos de transporte de prótons que desencadeiam a geração de ATP via ATP-sintase.

Cammarota & Freire (2006) relatam que, em sistemas anaeróbicos, devido à formação de uma película sobre os flocos biológicos, a difusão de substratos solúveis para o interior da célula é prejudicada. A diminuição na disponibilidade de substrato também inibe a geração de ATP, já que não existem blocos construtivos suficientes para a formação dos compostos envolvidos nos processos metabólicos (JÖRDENING & WINTER, 2005).

Ambas as inibições em processos metabólicos, provocadas por altos teores de lipídeos em um efluente, ocasionam diminuição na eficiência global do tratamento biológico. Sendo assim, pode-se afirmar que elevados teores de O&G tornam a biodegradabilidade do efluente reduzida, ocasionando baixas razões DBO/DQO. A razão DBO/DQO é a forma comumente utilizada para verificar o quão biodegradável é determinado efluente, pois, segundo Von Sperling (2005) razões DBO/DQO menores que 0,25 demonstram forte característica recalcitrante, já que menos de 25% da matéria

orgânica é biodegradável. Esgotos domésticos, que são considerados bastante biodegradáveis, apresentam esta razão entre 0,42 a 0,59.

Visando à manutenção da qualidade das águas, bem como minimizar impactos ambientais, a Resolução CONAMA n° 357/2005 (Conselho Nacional do Meio Ambiente), em seu artigo 34, estabelece o limite de lançamento de O&G, em efluentes de qualquer fonte poluidora, com valor máximo de 20 mg.L⁻¹ para óleos minerais e de até 50 mg.L⁻¹ para óleos vegetais e gorduras animais. Já a resolução do estado do Paraná CEMA 070/2009 estabelece, para indústrias frigoríficas, um limite de 60 mg.L⁻¹ para O&G totais. Dentre os impactos ambientais provocados pelo lançamento de efluentes com O&G acima dos níveis aceitáveis, devido ao tratamento inadequado ou descarte *in natura*, descrevem-se a interferência na vida biológica aquática, a geração de matéria flutuante de aparência desagradável e a formação de películas sobrenadantes (CHIABAI *et al.*, 2005).

Altas concentrações de O&G podem inativar a ação dos microrganismos, sendo imprescindível a quebra dos lipídeos em moléculas de massa molar menor para obtenção de um tratamento eficiente (Masse *et al.*, 2001). Concluindo, a presença de elevados teores de O&G em efluentes é indesejável, pois este material é altamente recalcitrante, pode reduzir facilmente a eficiência das etapas biológicas de tratamento do efluente e ocasiona graves impactos ambientais quando lançado em corpos d'água.

2.4. PRODUÇÃO DE LIPASES E SEU USO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

2.4.1. Lipases

Lipases são enzimas classificadas como triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3), capazes de hidrolisar especificamente moléculas de óleos e gorduras, visto que catalisam a quebra da ligação éster nos triacilgliceróis produzindo moléculas mais simples (mono e diacilglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livres) (Figura 15). A atuação das lipases não é restrita à hidrólise em meio aquoso, estendendo-se também a ambientes aquo-restritos, onde estas enzimas catalisam reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (KRIEGER *et al.*, 2004).

As fontes de lipases são vegetais, como a mamona (*Ricinus communis*) e a canola (*Brassica napus*), animais, como o pâncreas de porco, e, principalmente, os microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo os gêneros

Rhizopus, *Candida* e *Pseudomonas* considerados as principais fontes produtoras desta enzima (PANDEY *et al.*, 1999).

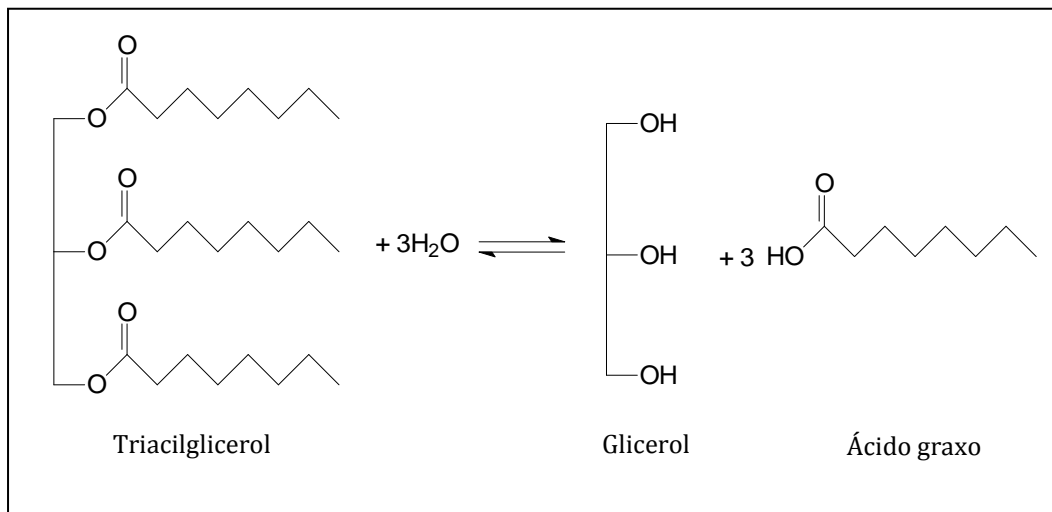


Figura 15. Quebra da ligação éster de triacilglicerol catalisada por uma lipase.

A estrutura típica de uma lipase apresenta como características o dobramento α/β hidrolase, um grupamento hidrofóbico *lid* ou tampa, presente em algumas lipases, além de uma tríade catalítica, conforme mostra a Figura 16.

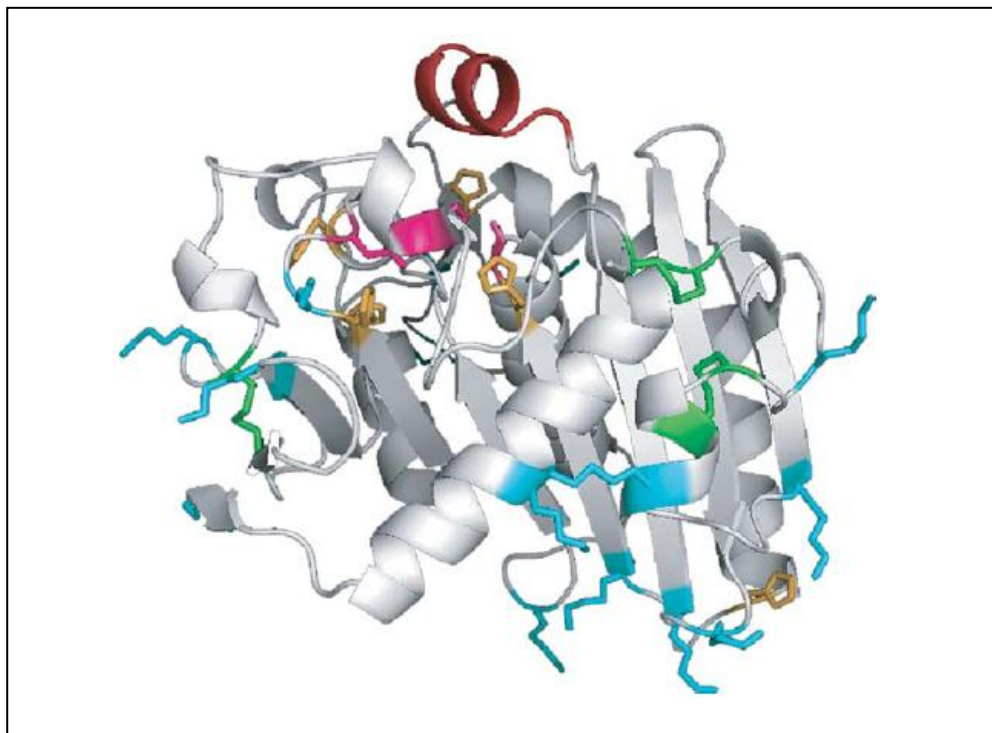


Figura 16. Representação de fitas da estrutura 3D da lipase de *Rhizopus oryzae*. Vermelho : *lid*, rosa : sítio ativo, laranja : resíduos de histidina, azul : resíduos de lisina, verde : resíduos de cisteína
Fonte: Bornscheuer (2008).

Observa-se na Figura 16 que a o grupamento *lid* (tampa) consiste em uma cadeia lateral que protege a tríade catalítica (sítio ativo). A *lid* é constituída por uma cadeia hidrofóbica e desta forma, quando substratos hidrofóbicos, tais como lipídeos, adsorvem-se na sua interface, alterações drásticas em sua conformação levam à abertura da *lid*, expondo o sítio ativo da lipase, promovendo o fenômeno chamado de ativação interfacial (Schrag *et al.*, 1997). Embora a Figura 16 descreva especificamente a estrutura de uma lipase fúngica, a maioria das lipases conhecidas apresentam o fenômeno de ativação interfacial, com exceção das lipases de *P. glumae*, *P. aeruginosa* e *C. antarctica* B, devido a presença de um grupamento *lid* muito pequeno (Bornscheuer *et al.*, 2002).

Já o dobramento α/β hidrolase é representado na Figura 16 pelas setas e fitas em espiral. A tríade catalítica, cujos resíduos de cadeia lateral são representados na Figura 16 através de uma estrutura molecular de varetas (na cor rosa), consiste nos aminoácidos aspartato (Asp), histidina (His) e serina (Ser) (Bornscheuer, 2008). Na grande maioria das lipases conhecidas a tríade catalítica é constituída pelos mesmos aminoácidos (aspartato, histidina e serina), com exceção das lipases de *Geotrichum candidum* e *C. rugosa*, onde o glutamato substitui o aspartato (BORNSCHEUER *et al.*, 2002).

Diyorov *et al.* (1994) estudaram duas cepas distintas de *R. microsporus*, isolando e identificando as lipases produzidas por estas cepas fúngicas. Neste estudo, os pesquisadores identificaram que a cepa UzLT-5C produzia cinco lipases diferentes, sendo duas delas encontradas de forma extracelular (com 24 e 43 kDa de massa molecular) e as outra três encontradas tanto intra como extracelulares (com 32, 66 e 98 kDa). As três lipases encontradas foram identificadas em fases distintas do crescimento fúngico, sendo a lipase de 66 kDa formada durante a fase de crescimento e as lipases de 32 e 98 kDa, durante a fase estacionária.

A cepa UzLT-4B de *R. microsporus* que Diyorov *et al.* (1994) estudaram foi capaz de produzir quatro lipases diferentes, sendo duas extracelulares (45 e 69 kDa) e duas intracelulares (28 e 40 kDa). Estes autores também identificaram sítios na parede celular especializados na exportação de lipases. Estes sítios foram considerados como sendo canais de rápida abertura e fechamento e com alta permeabilidade, permitindo a passagem de moléculas acima do limite comum de difusão facilitada de 20 kDa pela parede celular. Sendo assim, os autores admitem que o mecanismo de exportação das lipases produzidas por *R. microsporus* para o meio extracelular ocorre via um mecanismo diferente daquele proposto por Schekman (mecanismo típico fúngico), já que neste fungo os canais de alta permeabilidade e de rápida abertura/fechamento são os principais responsáveis pelo fenômeno.

2.4.2. Processos de Produção de Lipases

A aplicação de enzimas em processos industriais passa pela redução do custo de produção destas, que é elevado, considerando que enzimas comerciais são normalmente produzidas por fermentação submersa (FS), cujos custos são relativamente altos. Neste contexto, a fermentação no estado sólido (FES) aparece como uma alternativa econômica para a produção de enzimas, pois utiliza substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, dentre os quais diversos bagaços como os de milho, de cana de açúcar, de mandioca, tortas resultantes da extração de óleos vegetais, como de oleaginosas e cereais. Além disso, estudos prévios mostraram que não há necessidade de extrair a enzima do sólido fermentado, pois este pode ser utilizado diretamente no meio reacional, seja no processo de pré-hidrólise de efluentes com elevado teor de gorduras, ou em reações de síntese de ésteres (ALBERTON *et al.*, 2010, SALUM *et al.*, 2010).

No ano de 2000, Castilho e colaboradores realizaram um estudo de viabilidade econômica da FES frente à FS. Para uma produção de 100 m³ de concentrado de lipase por ano a partir da fermentação de *Penicillium restrictum*, o investimento necessário à FS mostrou-se 78% maior que o necessário a FES. Além disso, o custo de produção das lipases por FES mostrou-se 47% menor que o seu preço de venda. Já o custo de produção por FS mostrou-se 68% maior que o preço de venda das enzimas. Segundo Li & Zong (2010), embora o uso industrial de lipases esteja crescendo em escala mundial, o maior empecilho para a fabricação de produtos populares ou uso no tratamento de efluentes oleosos, ainda está relacionado ao seu custo de produção. Segundo estes autores, a FES apresenta-se como a técnica mais promissora para derrubar tais paradigmas, principalmente pelo baixo custo do processamento de resíduos agroindustriais e agregação de valor comercial a um resíduo de pouca utilidade.

A técnica de FES é definida como aquela que utiliza o crescimento de microrganismos em um material sólido com umidade, porém ausente ou quase-ausente de água livre. Segundo Pandey (2005), as vantagens oferecidas pela FES frente à FS são a maior produtividade volumétrica, relativamente maior concentração de produtos, menor geração de efluentes e resíduos, e, por fim, maior simplicidade dos equipamentos utilizados no processo.

Pandey *et al.* (2004) compararam o potencial da esponja de *nylon* e de resíduos agroindustriais como substratos visando à produção de lipases, e concluíram que as atividades obtidas por FES nos resíduos agroindustriais foram, em média, cinco vezes maiores do que as obtidas no suporte inerte. Sendo assim, a FES representa uma interessante alternativa para a reciclagem de resíduos agroindustriais e redução dos

custos de produção de lipases, como relatam Santos *et al.* (2004) e Von Meien & Mitchell (2002).

Sun & Xu (2008) produziram a lipase de *Rhizopus chinensis* por FES com farinha e farelo de trigo. Neste estudo, atingiu-se uma atividade máxima de 24447 U.kg substrato⁻¹ a partir de um sólido com 70% de umidade, pH 6,5, 2% de peptona e 2% de óleo de oliva (como indutor para produção de lipases).

Salum *et al.* (2010) produziram a lipase de *Burkholderia cepacia* por FES, utilizando como substrato bagaço de cana e farelo de girassol. O sólido obtido com 75% de umidade e pH 7,0 obteve uma atividade de 243 U.g SS⁻¹.

Ramania *et al.* (2010) também utilizaram um resíduo sólido de pouco valor agregado para a produção de lipases, sebo de carne gerado por uma indústria frigorífica. Porém, nesta pesquisa, adotou-se a FS por *Pseudomonas gessardii* utilizando uma solução nutriente (tampão PO₄²⁻ pH 5, NaCl, CaCl₂) com 1% (m/v) do resíduo de sebo. Estes autores obtiveram uma atividade lipolítica de 139 U.mL⁻¹ no extrato cru produzido por FS.

Yang *et al.* (2010) imobilizaram lipases comerciais (Merck) de *Candida antarctica* em sílica-PEG gel, obtendo atividades aproximadamente entre 8 . 10⁵ a 1 . 10⁶U por grama de suporte. Embora tais atividades sejam bastante elevadas, o custo de produção deste sólido é muito alto, dado ao elevado custo das enzimas comerciais.

O potencial da FES para a produção de enzimas, visando sua aplicação em sistemas de tratamento de efluentes, também pode ser bastante interessante, conforme demonstram os estudos de Alberton *et al.* (2010), Ramani *et al.* (2010), Rosa *et al.* (2009), Rigo *et al.* (2008), Damasceno *et al.* (2008), Durlly (2007), Valladão *et al.* (2007), Cammarota & Freire, (2006), Lanciotti *et al.* (2005), El-Bestwy *et al.* (2004) e Jung *et al.* (2002), descritos no item 2.4.3.

2.4.3. Aplicação de Lipases no Tratamento de Efluentes

O tratamento enzimático consiste em aplicar no efluente, previamente aos tratamentos convencionais, uma preparação enzimática, sendo o seu principal componente, no caso específico para a remoção de O&G, uma lipase. Desta forma, o efluente pré-hidrolisado pode apresentar uma grande redução na concentração de O&G, e, por consequência, redução na carga orgânica e pouco ou nenhum efeito recalcitrante. Sendo assim, as etapas secundárias subseqüentes poderão diminuir seu tempo de retenção hidráulica, volume de reatores, requisitos de oxigênio (potência de aeração) e, conseqüentemente, os custos do processo (LEAL *et al.*, 2002).

O pré-tratamento enzimático de efluentes pode ser realizado tanto com a enzima isolada de um microrganismo, na forma de extrato bruto, ou imobilizada em um suporte sólido. Também se pode adotar o próprio microrganismo que produz a lipase, inoculando-o diretamente no efluente ou imobilizando-o em um leito fixo. Em trabalhos recentes, diferentes grupos têm proposto a utilização de lipases produzidas por FES (Fermentação no Estado Sólido), onde as enzimas estão imobilizadas no próprio substrato de fermentação, sendo o sólido fermentado adicionado diretamente ao efluente.

A aplicação das lipases no tratamento de efluentes já é objeto de estudos há alguns anos, como relatam Jung *et al.* (2002), que trataram efluentes com concentração de 800 mg.L⁻¹ de O&G com lipases produzidas pelo fungo *P. restrictum* em FES. Neste estudo foi obtida uma remoção de 82% na DQO após tratamento aeróbio, enquanto o controle que foi submetido apenas ao tratamento aeróbio apresentou remoção praticamente nula. Por outro lado, Lanciotti *et al.* (2005) estudaram o uso da bactéria *Yarrowia lipolytica* para o tratamento de efluentes de processos de extração de azeite de oliva, mostrando uma eficiência na remoção da DQO do efluente bruto entre 20 e 40%. El-Bestwy *et al.* (2004) também realizaram o tratamento de efluentes de elevadas concentrações de O&G, através de bactérias produtoras de lipases, obtendo uma remoção de DQO de até 93% após o tratamento secundário.

Em estudos mais recentes, Valladão *et al.* (2007), mostraram o aumento da concentração de ácidos graxos livres ao longo do tempo, em efluente de abatedouro de aves e laticínios, hidrolisado com a lipase de *P. restrictum* produzida por FES. Tal resultado é de muito interesse, pois a formação de ácidos graxos livres é acompanhada da redução no efeito recalcitrante do efluente, visto que estas são moléculas mais simples que as cadeias de lipídeos (óleos e gorduras) não hidrolisadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Durli (2007) utilizando efluente de laticínio, com teor de O&G entre 167 e 341 mg.L⁻¹, de uma indústria na Região Metropolitana de Curitiba. Foi observada a produção gradativa e linear de ácidos graxos livres até 5 h após o tratamento enzimático (bateladas em frascos Erlenmeyer) com lipase da bactéria *Burkholderia cepacia* LTEB11 obtida por FES (utilizando farelo de girassol como substrato). Durli (2007) atingiu uma remoção máxima de 80% na concentração de O&G, após 24 h de tratamento. Passadas estas 24 h de incubação, ocorreu também o crescimento da bactéria no efluente, com produção de lipases, atingindo uma razoável atividade enzimática (4,3 U.mL⁻¹) no efluente após 72 h de incubação.

Jeganathan *et al.* (2007) estudaram o tratamento em fluxo contínuo (4 a 12 L/dia) de um efluente de produção de ração animal (O&G entre 1000 e 2000 mg.L⁻¹), utilizando um reator de pré-hidrólise com lipase comercial de *Candida rugosa* (Sigma-Aldrich,

imobilizadas em alginato de cálcio). O efluente pré-hidrolisado foi em seguida alimentado em um reator anaeróbico. Os autores obtiveram, durante 100 dias de experimentos, teores de O&G abaixo de 100 mg.L^{-1} frente a teores entre 100 e 300 mg.L^{-1} no teste controle (sem pré-hidrólise). Notou-se também maior geração de biogás e estabilidade operacional no reator alimentado com o efluente pré-hidrolisado.

Wu *et al.* (2009) estudaram o uso de lipases de *Y. lipolytica* produzida por FS e imobilizada em alginato de cálcio de um efluente sintético de uma mistura de água e óleo de salada (com DQO e O&G ambos padronizados em 2000 mg.L^{-1}). Neste estudo, adotando bateladas de 50 h em frascos Erlenmeyer de 500 mL, obteve-se uma redução de 80% na DQO e 70% no teor de O&G do efluente sintético.

Damasceno *et al.* (2008) estudaram o impacto da aplicação de um preparado enzimático de lipases (sólido fermentado por *P. Restrictum*) em um sistema de lodos ativados (reator aeróbico com 3,4 L). Neste estudo, alimentou-se o reator em fluxo contínuo ($2,4 \text{ mL.min}^{-1}$) com um efluente de laticíneo, realizando cargas choque de gordura periódicas (adição de 2 L de efluente com O&G de 1200 mg.L^{-1}). Neste estudo, a eficiência na remoção da DQO foi de 90% frente a 83% no teste controle (sem aplicação do sólido fermentado). Além disso, durante os 270 dias de experimentos, não foram notados problemas operacionais com o sistema de lodos ativados, mostrando a influência positiva da adição destas lipases.

Rigo *et al.* (2008) compararam a eficiência da pré-hidrólise no tratamento anaeróbico em bateladas de um efluente frigorífico (O&G de 250 a 3000 mg.L^{-1}), através da aplicação de lipases comerciais (Lipolase 100T Novozymes) e do sólido fermentado produzido por *P. restrictum*. Neste estudo, obteve-se maior biodegradabilidade no efluente pré-hidrolisado com o sólido fermentado, já que, devido à grande atividade lipolítica da enzima comercial, houve grande liberação de ácidos livres, abaixando excessivamente o pH e tornando-o menos biodegradável. Além disso, o efluente pré hidrolisado com 0,1% (m/v) de sólido fermentado, apresentou uma redução na DQO 22% maior que o teste controle.

Rosa *et al.* (2009) estudaram o efeito da aplicação de 0,1% (m/v) de sólido fermentado por *Penicillium sp.* em um efluente de laticínio com teor de O&G de 1200 mg.L^{-1} em reatores anaeróbicos com bateladas de 48 h. Nesta pesquisa, obteve-se uma eficiência de 90% na remoção da DQO frente a 32% no teste controle (sem aplicação do sólido fermentado). Os teores de O&G no tratamento com adição do sólido fermentado permaneceram abaixo de 150 mg.L^{-1} , enquanto no teste controle os resultados mostraram valores acima de 250 mg.L^{-1} .

Alberton *et al.* (2010) realizaram o tratamento enzimático com a lipase produzida por *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM em efluentes provenientes da mesma indústria

do estudo de Durlí (2007). Porém, Alberton *et al.* (2010) padronizaram o teor de O&G, com a adição de gordura animal, em 1000 mg.L⁻¹. A lipase também foi produzida por FES, utilizando uma mistura 1:3 de farelo de girassol moído e bagaço de cana de açúcar. Após 120 h de tratamento, a redução no teor de O&G no efluente tratado com o sólido fermentado, esporos e extrato bruto foi de 91%, 86% e 77% respectivamente. Considerando que a ação da enzima produz apenas a quebra da ligação éster, e conseqüente liberação de ácidos graxos, porém sem a degradação destes, a redução encontrada nos valores de ácidos graxos foi atribuída ao consumo destes por *R. microsporus*. Tal fato foi comprovado pela formação de massa miceliana em todos os casos estudados, indicando o crescimento do fungo no efluente. Estes resultados motivaram o presente trabalho, que visa à continuação dos estudos de Alberton *et al.* (2010), com o objetivo de viabilizar a aplicação do pré-tratamento enzimático com o sólido fermentado em biorreator de leito fixo operado em fluxo contínuo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver e estudar o processo contínuo de pré-hidrólise enzimática de efluente com elevado teor lipídico em escala de bancada, utilizando como modelo um biorreator de leito fixo preenchido com o sólido fermentado produzido por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a lipase de *R. microsporus* por FES, utilizando como substrato a mistura de bagaço de cana e farelo de girassol, conforme metodologia já otimizada e descrita por Alberton *et al.* (2010);
- Dimensionar um biorreator aeróbico de leito fixo em coluna com base nos requisitos de tempo de crescimento de *R. microsporus* em um efluente conforme descrito por Alberton *et al.* (2010);
- Coletar e caracterizar um efluente de elevado teor lipídico através de análises físico-químicas;
- Avaliar a eficiência do tratamento de pré-hidrólise enzimática pela redução dos teores de DQO, DBO e O&G no clarificado;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em dois laboratórios. A manutenção do microrganismo e a produção do sólido fermentado foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. As análises físico-químicas do efluente e os experimentos com o biorreator foram desenvolvidos no Laboratório Físico-Químico do SENAI CIC (Cidade Industrial de Curitiba).

4.1. MATERIAIS

A tricaprilina utilizada na medição da atividade de lipase e o cloranfenicol, utilizado para inibir o crescimento de bactérias no ágar foram adquiridas da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O sulfato ferroso amoniacal e dicromato de potássio (utilizados na determinação da DQO) e o n-hexano (utilizado na determinação do O&G), foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os demais reagentes utilizados nas determinações físico-químicas tinham a pureza necessária ao ensaio, normalmente grau analítico.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Produção do Inóculo e Manutenção do Microrganismo

R. microsporus foi cultivado em placas de Petri utilizando caldo PDA (ágar dextrose batata) 39 g.L⁻¹ previamente esterilizado em autoclave (Bio Eng A75) a 120 °C por 15 min. As placas com *R. microsporus* foram incubadas em estufa de cultivo (Quimis Q316M4) a 30 °C até a formação de esporos (entre 5 a 7 dias). Repiques semanais foram realizados para a manutenção da cepa fúngica.

4.2.2. Produção da Lipase por Fermentação no Estado Sólido

A produção da lipase de *R. microsporus* foi realizada por FES, utilizando como substrato uma mistura de bagaço de cana de açúcar e farelo de girassol. O bagaço de cana moído foi lavado 3 vezes com água e em seguida seco em estufa a 100 °C por 24 h. A semente de girassol foi triturada em um moinho elétrico e tamisada em peneiras de 0,85 e 1,4 mm, onde se obteve a fase intermediária destas peneiras e descartou-se o restante.

Em cada frasco Erlenmeyer de 1000 mL, de um total de 7 frascos, adicionou-se 40 g de uma mistura 3:1 de bagaço de cana e farelo de girassol, esterilizando-os em autoclave (120 °C por 15 min).

Os esporos de *R. microsporus* foram transferidos a 100 mL de uma solução de Tween 80 (3 gotas em 100 mL de água destilada) previamente esterilizada (autoclave, 120 °C por 15 min). Esta solução de esporos foi então agitada a aproximadamente 1200 rpm por 1 h em agitador magnético. Após agitação, realizou-se a contagem do número de esporos em Câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico, e transferiu-se o volume correspondente a $1,2 \cdot 10^9$ esporos para um béquer contendo 160 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0 (previamente esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min). Esta solução foi então transferida para cada Erlenmeyer contendo a mistura 3:1 bagaço de cana e farelo de girassol. Homogeneizaram-se manualmente os frascos em seguida.

Os Erlenmeyers foram então incubados em estufa de cultivo a 40 °C por 18 h para fermentação. Após este período o conteúdo dos frascos foi retirado e homogeneizado manualmente em um recipiente único. Uma alíquota de aproximadamente 5 g foi retirada (após quarteamento) para medição da atividade de lipase. Em seguida o sólido fermentado foi transferido para sacos plásticos, que foram fechados e armazenados em um congelador (Electrolux H400) a -18 °C.

Estes procedimentos foram repetidos até obter-se 2 kg de sólido fermentado (massa suficiente para preenchimento do biorreator).

4.2.3. Determinação da Atividade de Lipase

A determinação de lipases por titulometria é um método baseado no que foi proposto por Stuer *et al.* (1986) com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH 50 mmol.L⁻¹ dos ácidos graxos liberados pela ação da lipase sobre triacilgliceróis presentes em uma emulsão.

Para determinação da atividade lipolítica, uma massa de aproximadamente 85 mg do sólido fermentado foi adicionado a 20 mL de uma emulsão contendo: tampão Tris-HCl $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, goma arábica 3% m/v, CaCl_2 2 mmol.L^{-1} , NaCl 150 mmol.L^{-1} e tricaprilina 63 mmol.L^{-1} . Estas determinações foram realizadas em equipamento do tipo pH Stat (718 Stat Titrimo, Metrohm) ajustado para titular por 10 min em pH 7,0. Uma unidade de atividade enzimática (U) é equivalente a $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de ácido graxo produzido por minuto. Nestes ensaios, a atividade enzimática foi medida em unidades de atividade por massa de sólido seco (U.g SS^{-1}).

4.2.4. Coleta e Caracterização do Efluente de Frigorífico

Para a coleta do efluente da indústria frigorífica utilizou-se um tambor plástico de 250 L, 7 bombonas plásticas de 35 L e um balde plástico de 2,5 L. Todos estes recipientes foram previamente lavados com solução de Extran a 10% e enxaguados com água.

Com o auxílio do balde de 2,5 L foi preenchido o tambor de 250 L com o efluente coletado na saída da peneira estática (entrada da caixa de gordura). Em seguida, o efluente foi homogeneizado dentro do tambor e distribuído nas 7 bombonas de 35 L com o auxílio do balde de 2,5 L e de um funil. As bombonas contendo o efluente foram então armazenadas em um congelador a $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$. A Figura 17 mostra o ponto onde foi realizada esta coleta.



Figura 17. Coleta do efluente no sistema preliminar de tratamento da indústria frigorífica. a) Detalhe do ponto em que foi realizada a coleta do efluente. b) Vista geral do tratamento preliminar. Detalhe para o funcionário que executa a retirada da gordura flotada em média cinco vezes ao dia.

A caracterização físico-química do efluente foi realizada segundo os métodos padrão para análise de águas e efluentes – Standard Methods 21ª edição (APHA, 2006). A caracterização contemplou as seguintes análises:

- pH – método potenciométrico 4500-H⁺;
- DQO – método titulométrico/refluxo aberto 5220 B;
- DBO – método potenciométrico/incubatório 5210 B;
- O&G – método gravimétrico/extração Soxhlet 5520 D;
- Cloretos – método argentométrico 4500-Cl⁻ B
- Nitrogênio Kjeldhal – método macro Kjeldhal 4500-N_{org}B;
- Nitrogênio amoniacal – método titulométrico 4500-NH₃C;

O princípio dos métodos analíticos de DQO, DBO e O&G, principais parâmetros estudados neste trabalho, são descritos nos itens 4.2.5 a 4.2.7.

4.2.5. Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A análise de DQO é baseada em uma oxidação enérgica da matéria orgânica, utilizando dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em excesso como agente oxidante, sob catálise ácida (solução de Ag⁺ em H₂SO₄ concentrado) e em refluxo a quente por 2 h. A reação química que descreve a oxidação da matéria orgânica (C₈H₆O₄) neste processo é dada pela Figura 18 (APHA, 2006).

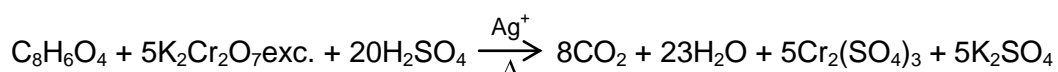


Figura 18. Reação de oxidação da matéria orgânica, pelo dicromato de potássio, durante 2 h de refluxo a quente para determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).

Conforme Figura 18, ao final das 2 h de refluxo, é titulado o excesso de dicromato (que não reduziu a cromato) com uma solução de sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂), e a diferença entre o dicromato consumido e o excesso titulado é equivalente à quantidade de matéria orgânica presente na amostra (APHA, 2006). Segundo o Standard Methods (APHA, 2006), o limite de quantificação da medição titulométrica da DQO por refluxo aberto é de 5,0 mg O₂.L⁻¹, com um coeficiente de variação de 6,5 a 10,8%.

4.2.6. Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

A determinação da DBO consiste em quantificar o consumo de OD (oxigênio dissolvido), durante um período de incubação de 5 dias, de uma amostra diluída em água saturada em OD, pH entre 6,5 a 7,5, concentrações ótimas de micronutrientes (Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e tampão fosfato) e com uma população inicial de microrganismos capazes de realizar a degradação biológica da matéria orgânica (inóculo de um pequeno volume de esgoto doméstico bruto). Esta solução, bem como a amostra a ser analisada, são transferidas para um frasco de Winkler, onde é imediatamente medido o teor de OD. O frasco é então incubado a 20 °C por 5 dias, quando é novamente medido o OD no frasco. A diferença nos teores de OD imediato e após 5 dias de incubação são equivalentes à quantidade de matéria orgânica biologicamente consumida (APHA, 2006).

Segundo Standard Methods 21ª edição (APHA, 2006), muitos fatores afetam os ensaios de DBO, desta forma, os desvios das medidas são extremamente acentuados. Recomenda-se que testes interlaboratoriais sejam realizados para estabelecer os limites de controle aceitáveis para o procedimento adotado. Embora o Standard Methods não forneça valores típicos de coeficiente de variância, na prática, ao longo da rotina de análises laboratoriais, desvios em torno de 30% são geralmente obtidos.

4.2.7. Determinação da Concentração de Óleos e Graxas (O&G)

A determinação do teor de O&G consiste em uma extração líquido-líquido de materiais graxos em um solvente hidrofóbico, geralmente hexano. O método por extração Soxhlet consiste em inicialmente acidificar a amostra com uma solução de HCl, em seguida filtrá-la em disco de papel de filtro previamente coberto com uma camada auxiliar de filtração (suspensão aquosa de Celite 1% e Caolim 0,5%). Após filtração, o papel filtro contendo os materiais graxos retidos é inserido em um cartucho de extração Soxhlet. Conecta-se ao equipamento de extração Soxhlet o cartucho com a amostra e um balão de vidro (previamente tarado) com hexano. Após 1 h de extração a 100 °C, o balão é removido do equipamento e evapora-se o hexano residual. A diferença de massa entre o balão tarado e após extração Soxhlet representa gravimetricamente a concentração de O&G da amostra (APHA, 2006).

O limite de quantificação da extração Soxhlet é de 5,0 mg.L⁻¹, com desvios de aproximadamente 8% (APHA, 2006).

4.2.8. Dimensionamento e Montagem do Biorreator

Para realização dos experimentos propostos neste trabalho, foi construído um biorreator aeróbico de leito fixo em coluna, de fluxo ascendente, cilíndrico, fabricado em PVC (policloreto de vinila). Em sua porção inferior o biorreator possui uma câmara falsa, onde foi realizada a alimentação do efluente e a entrada da aeração. No topo desta câmara falsa, localizava-se uma tela de peneira, utilizada para suportar o peso do leito fixo empacotado acima da câmara falsa. Ao longo de sua altura útil, o biorreator foi empacotado com o sólido fermentado por *R. microsporus*, formando seu leito fixo. A alimentação do biorreator ocorreu por meio de uma bomba peristáltica (Milan 202), de vazão ajustável entre 0,8 a 10,0 mL.min⁻¹. O biorreator foi dimensionado de forma a possibilitar a variação do tempo de retenção hidráulico no reator entre 24 a 120 h. Tais valores foram escolhidos com base no tempo de crescimento de *R. microsporus* (formação de micélio) no efluente adotado no estudo de Alberton *et al.* (2010) que determinaram que a partir de 24 h houve formação de micélio em efluente de laticínios com elevado teor de lipídeos. A partir dos tempos de retenção e das vazões de entrada (valores adotados), calculou-se o volume útil (Equação 1), e altura útil (Equação 2) do biorreator, adotando-se um diâmetro de 100 mm, conforme mostra a Tabela 2.

$$TRH = V_u/Q \quad \text{Equação 1.}$$

Sendo:

TRH: tempo de retenção hidráulico (h);

V_u : Volume útil (m³);

Q: Vazão de entrada (m³.h⁻¹).

$$V_u = A.h_u \quad \text{Equação 2.}$$

Sendo:

V_u : Volume útil (m³);

A: Área de secção circular (m²);

h_u : altura útil (m).

Tabela 2. Valores obtidos no dimensionamento do biorreator de leito fixo.

Parâmetro	Valores	Forma utilizada para calcular o parâmetro
Tempo de retenção (h)	24 a 120	Valores adotados de Alberton <i>et al.</i> (2010)
Vazão de entrada (mL.min ⁻¹)	1,0 a 5,0	Valores adotados conforme vazão da bomba peristáltica
Diâmetro (cm)	10,0	Valor adotado conforme diâmetros disponíveis para tubos de PVC
Volume útil ³ (L)	7,2	Vazão x tempo de retenção ¹
Altura útil para o leito fixo (cm)	92,0	Volume útil/Área de superfície ¹
Altura câmara falsa (cm)	10,0	Valor adotado
Altura de segurança ² (cm)	8,0	Valor adotado
Altura total (cm)	110	Valor adotado
Velocidade ascensional (cm.h ⁻¹)	0,76 a 3,81	Vazão/Área de superfície ¹

(1) As equações utilizadas foram obtidas de Grady *et al.* (1999).

(2) Altura acima da tubulação de saída do clarificado, visando evitar transbordamento.

(3) O volume útil foi considerado como o volume total destinado ao empacotamento do leito fixo, não o volume livre dos poros.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, o biorreator foi dimensionado em função de seu tempo de retenção hidráulico e de sua vazão de entrada, cujos valores adotados foram reduzidos (de 1,0 a 5,0 mL.min⁻¹). Isto ocorreu devido a limitações na operação deste. Como os experimentos utilizaram fluxo contínuo, fazia-se necessário o armazenamento e congelamento do efluente bruto em bombonas plásticas. Sendo assim, para minimizar o uso destas bombonas e o seu armazenamento, foram adotadas vazões de entrada bastante reduzidas. A Figura 19 ilustra o biorreator construído, bem como detalhes do sistema de tratamento como um todo. O oxigênio dissolvido (OD) foi fornecido por um aerador de aquário (SevenStar S6000) com regulação de vazão e duas mangueiras flexíveis para distribuição do ar, uma no interior da câmara falsa, e outra na metade da altura útil do biorreator (visando à manutenção de no mínimo 2,5 mg.L⁻¹ de OD ao longo de toda a altura útil do biorreator).

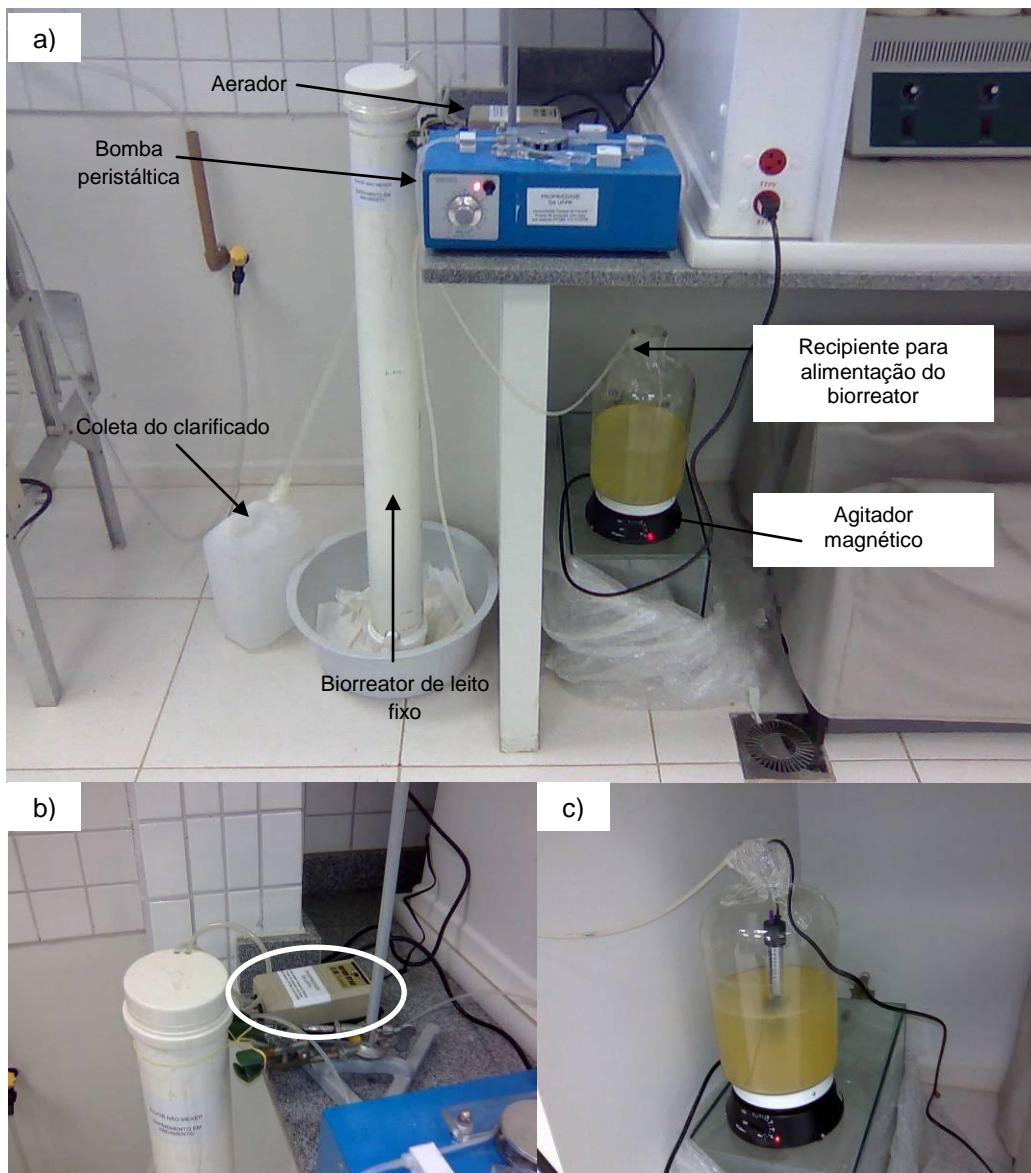


Figura 19. Sistema de pré-hidrólise enzimática em biorreator de leito fixo com fluxo contínuo. a) Vista geral do biorreator e demais equipamentos. b) Detalhe do sistema de aeração. c) Detalhe do recipiente de alimentação com agitador magnético e termostato com aquecimento.

4.2.9. Tratamento de Pré-Hidrólise do Efluente de Frigorífico

Inicialmente os sacos plásticos contendo o sólido fermentado foram retirados do congelador e descongelados em geladeira convencional (4 °C) por 24 h. Em seguida os sacos foram colocados em uma estufa de DBO a 20 °C por 1 h. Após este período homogeneizou-se o conteúdo de cada saco plástico em um recipiente único, retirando-se novamente uma alíquota de aproximadamente 5 g (após quarteamento) para medição da atividade de lipase. O biorreator foi então preenchido com 1,25 kg de sólido fermentado (massa necessária para ocupar os 0,92 m de altura útil do biorreator) e deu-se início aos experimentos de pré-hidrólise enzimática.

Para tanto, o efluente de frigorífico foi diariamente transferido para um recipiente onde se corrigiu o pH para a faixa neutra (7,0 a 7,2) com solução de hidróxido de sódio a 15%. A correção do pH fez-se necessária pois a lipase produzida por *R. microsporus* possui atividade máxima em pH neutro (7,0 a 7,2). A temperatura foi mantida a 20 °C com o auxílio de um termostato com aquecedor, visando aproximar a temperatura do efluente com a temperatura ambiente padrão. Um agitador magnético foi utilizado para manter a homogeneidade do efluente. Deste recipiente, alimentou-se o biorreator com o efluente em fluxo ascendente controlando-se a vazão de entrada da bomba peristáltica visando fornecer, inicialmente, 120 h de retenção hidráulica no biorreator. Para isto, foi adotada uma vazão de 1 mL.min⁻¹ medida com o auxílio de uma proveta colocada na saída do clarificado (efluente tratado).

Medições diárias no clarificado foram realizadas, tais como pH, DQO, DBO e O&G. Visando controle operacional, monitorou-se diariamente a atividade de lipase e teor de OD no leito do biorreator (conforme item 4.2.10), bem como a temperatura do efluente bruto e do clarificado. Estas medições foram realizadas durante no mínimo 14 dias seguidos.

Com os valores obtidos, calculou-se a eficiência do processo quanto à remoção na concentração de DQO, DBO e O&G, conforme Equação 3.

$$\text{Eficiência} = [(C_0 - C)/C_0] \cdot 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

Eficiência: percentual de remoção na concentração de DQO, DBO ou O&G (%);

C₀: concentração de DQO, DBO ou O&G no efluente bruto (mg.L⁻¹);

C: concentração de DQO, DBO ou O&G no efluente tratado (mg.L⁻¹);

Após este período mínimo de 14 dias, a vazão de entrada foi alterada para 2 mL.min⁻¹ (por no mínimo mais 14 dias), 3 mL.min⁻¹ (por no mínimo mais 14 dias), 4 mL.min⁻¹ (por no mínimo mais 14 dias) e 5 mL.min⁻¹ (por no mínimo mais 14 dias), visando fornecer respectivamente 96, 72, 48 e 24 h de retenção hidráulica no biorreator. As mesmas medições e controles foram adotados com estas vazões de entrada.

Visando verificar se ao final destas bateladas de experimentos ainda havia presença significativa de *R. microsporus*, coletou-se uma alíquota de aproximadamente 5 g do sólido do topo do biorreator (5 a 10 cm de profundidade em relação a saída do biorreator). Esta alíquota foi então inoculada em duas placas de Petri distintas, uma delas contendo apenas ágar PDA 39 g.L⁻¹ e outra contendo ágar PDA 39 g.L⁻¹ e cloranfenicol 100 mg.L⁻¹ (antibiótico utilizado para inibir o crescimento de bactérias). Estas placas

foram então incubadas a 30 °C por 5 dias. Foi realizada também a microscopia óptica de ambas as placas após a incubação.

Ao término destes experimentos, realizou-se um teste controle, que consistiu em preencher o biorreator apenas com a mistura 3:1 de bagaço de cana:farelo de girassol esterilizado (autoclave), ou seja, sem o inóculo de *R. microsporus*. As mesmas análises físico-químicas foram adotadas neste experimento, porém foi realizado apenas a medição da eficiência do processo com 120 e 24 h de retenção no biorreator (valores máximo e mínimo respectivamente).

4.2.10. Determinação da Atividade de Lipase e do Oxigênio Dissolvido (OD) no Biorreator

A medição da atividade de lipase no sólido do leito do biorreator foi realizada conforme item 4.2.3, após extração de alíquotas diárias de aproximadamente 0,2 g do leito do biorreator (coletadas de 5 a 10 cm de profundidade em relação a saída do biorreator) e posterior secagem em estufa a 40 °C por 1 h.

A medição do OD no interior do biorreator foi realizada com o auxílio de um oxímetro (Digimed DM-4P) conforme procedimento 4500-O G do Standard Methods (APHA, 2006). A sonda de OD do oxímetro foi inserida no topo do biorreator, medindo o teor de OD a uma profundidade de 5 a 10 cm em relação a saída do biorreator.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ATIVIDADE DE LIPASE DO SÓLIDO FERMENTADO

A mistura 3:1 bagaço de cana e farelo de girassol, após fermentação por *R. microsporus*, com tempo de cultivo de 18 h, apresentou atividade lipolítica de 70 ± 7 U.g SS⁻¹. Este resultado é maior que o descrito por Alberton *et al* (2010), que obtiveram 51 ± 4 U.g SS⁻¹.

Como o sólido fermentado após o término do cultivo foi armazenado a -18 °C, em seguida descongelado e utilizado úmido nos experimentos, foi comparada a atividade do sólido depois do congelamento. Observou-se que o sólido depois de armazenamento a -18 °C por 15 dias e descongelado conforme item 4.3.6 perdeu 47% de sua atividade, apresentando um valor de 33 ± 2 U.g SS⁻¹.

A diminuição na atividade enzimática após ciclos de congelamento e descongelamento já foi reportada na literatura. Segundo Cohen *et al.* (2010) *apud* Gabellieri & Strambini (2003), este fenômeno é comum, e deve-se a alterações irreversíveis ocorridas nas ligações de hidrogênio das enzimas, ocasionando sua desnaturação. Além disso, ao atingir-se o ponto de congelamento ocorre expansão do volume de água (comportamento anômalo das ligações de hidrogênio na água que expandem a 0 °C) podendo ocorrer alterações na camada de solvatação e conseqüente variação na conformação da enzima. Segundo Hu & Tycko (2010), a intensidade de algumas interações hidrofóbicas diminui com a redução da temperatura, dificultando a manutenção de sua conformação ativa pela deformação de sua estrutura terciária.

Apesar da perda de 47% da atividade enzimática do sólido fermentado, a sua atividade residual ainda foi considerada alta (33 ± 2 U.g SS⁻¹). Sendo assim, decidiu-se manter o procedimento de congelamento do sólido após o cultivo, visto que outras alternativas envolveriam a secagem do sólido em estufa ou liofilização, procedimentos que têm um custo mais elevado frente ao congelamento do material, mas, acarretam perdas de atividade menores (aproximadamente 15%, ALBERTON *et al.*, 2010).

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE DE FRIGORÍFICO

O efluente de elevado teor lipídico utilizado neste estudo foi coletado nos dias 25/03/2010 e 27/05/2010 em uma indústria frigorífica localizada em São José dos Pinhais, PR. A necessidade da realização de duas coletas ocorreu devido à quantidade

de efluente necessária para a realização de todos os experimentos. Porém nota-se na Tabela 3 que os parâmetros físico-químicos das amostras provenientes das duas coletas foram similares, levando em consideração que a característica intrínseca de um efluente varia muito ao longo do tempo de operação industrial.

Tabela 3. Caracterização físico-química do efluente de frigorífico utilizado neste estudo.

Parâmetro	1ª coleta	2ª coleta	Unidade	Método ¹
pH	6,6 ± 0,2	6,1 ± 0,3	---	Potenciometria
DQO	2706 ± 267	3250 ± 390	mg O ₂ .L ⁻¹	Refluxo aberto/Titulometria
DBO ₅	505 ± 92	603 ± 118	mg O ₂ .L ⁻¹	Winkler/Potenciometria
DBO ₅ /DQO	0,19	0,19	---	---
O&G	605 ± 9	601 ± 14	mg.L ⁻¹	Extração Soxhlet/Gravimetria
Cloreto	960 ± 5,5	1002 ± 6,5	mg Cl ⁻ .L ⁻¹	Argentometria/Titulometria
N _{total}	46,0 ± 4,6	67,0 ± 9,0	mg N.L ⁻¹	Macro Kjeldhal
N-NH ₃	4,8 ± 0,8	12,5 ± 2,4	mg NH ₃ .L ⁻¹	Titulométrico

(1) Todas as análises foram realizadas segundo Standard Methods 21ª edição (APHA, 2006).

Observa-se na Tabela 3 um alto teor de O&G (aproximadamente 600 mg.L⁻¹), o que provavelmente causou a baixa biodegradabilidade do efluente, visto que sua razão DBO/DQO foi de 0,19 nas duas coletas realizadas. Como visto anteriormente, segundo Von Sperling (2005), razões DBO/DQO menores que 0,25 demonstram forte característica recalcitrante. No efluente analisado, pode-se afirmar que esta característica está intimamente ligada à elevada concentração de O&G, já que os lipídeos são de difícil degradação biológica (conforme descrito no item 2.3.2).

Admite-se também que o potencial poluidor deste efluente é bastante elevado, já que sua DQO, é 13 a 16 vezes maior que o limite de lançamento de 200 mg O₂.L⁻¹ estabelecido pela resolução do estado do Paraná CEMA 070/2009. Além disso, embora pouco biodegradável, este efluente é capaz de criar um grande déficit de OD em um corpo receptor (quando lançado *in natura*), visto que sua DBO é 8 a 10 vezes maior que o limite de lançamento de 60 mg O₂.L⁻¹ estabelecido pela mesma resolução estadual.

Os elevados teores de nitrogênio mostrados na Tabela 3 (46 e 67 mg N_{total}.L⁻¹) são provavelmente decorrentes do uso de nitrito e nitrato como conservante na produção de salsichas, resultado comprovado pela grande diferença (46 mg N_{total}.L⁻¹ frente a 4,8 mg NH₃.L⁻¹ e 67 mg N_{total}.L⁻¹ frente a 12,5 mg NH₃.L⁻¹) existente em relação ao teor

de amônia e nitrogênio Kjeldhal. O alto índice de cloretos deve-se ao uso do cloreto de sódio no mesmo processo produtivo.

5.3. TRATAMENTO DE PRÉ-HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Os experimentos no biorreator de leito fixo foram seguidos durante 101 dias, utilizando-se diferentes vazões e TRH (tempo de retenção hidráulico), mostrados na Tabela 4. Para cada TRH foi adotado um tempo mínimo de 14 dias de experimentos, exceto para 120 e 72 h, onde houve a necessidade de repetição de alguns testes. Na transição entre cada valor de TRH, notou-se um período necessário à estabilização da DQO e DBO do clarificado de 2 dias.

Tabela 4. Variação da vazão de entrada no biorreator de leito fixo conforme tempo de retenção hidráulico.

Vazão de entrada (mL.min⁻¹)	Tempo de retenção hidráulico (h)	Tempo de experimento
1,0	120	16 dias de período de adaptação e 20 dias de experimentos
2,0	96	2 dias para estabilização e 14 dias de experimentos
3,0	72	2 dias para estabilização e 15 dias de experimentos
4,0	48	2 dias para estabilização e 14 dias de experimentos
5,0	24	2 dias para estabilização e 14 dias de experimentos

O pH do efluente bruto foi corrigido com hidróxido de sódio antes do tratamento enzimático, tendo apresentado valores dentro da faixa de 7,0 a 7,2. Mediu-se também a temperatura do efluente bruto na entrada do biorreator durante os ensaios, encontrando-se esta dentro da faixa de 18 a 24 °C.

No efluente de saída do biorreator, aqui denominado de “clarificado” ou “efluente clarificado” realizaram-se as mesmas determinações descritas acima. O pH do clarificado manteve-se na faixa de 6,8 a 7,3, e a temperatura variou entre 15 a 22 °C. A temperatura relativamente baixa obtida foi devida ao frio dos meses de inverno, pois mesmo com o

aquecimento do efluente bruto a 20 °C, o ar frio do sistema de aeração acabava por reduzir a temperatura no interior do biorreator.

Dentro do biorreator, foram mantidas condições aeróbicas ótimas, já que os teores de OD permaneceram entre 3,0 a 7,0 mg.L⁻¹ (acima de 2,5 mg.L⁻¹, mínimo ideal segundo Von Sperling, 2002). Os valores mais baixos de OD foram obtidos nos menores tempos de retenção no biorreator (24 e 48 h), já que, sob estas condições, a carga de matéria orgânica alimentada no biorreator era maior. Os parâmetros utilizados para medição da eficiência do tratamento de pré-hidrólise foram atividade de lipase, DQO, DBO e O&G.

5.3.1. Atividade de Lipase no Biorreator

A atividade de lipase no leito do biorreator foi medida visando identificar a ocorrência ou não de desorção da enzima ou perda de atividade do leito fixo durante todo o período de pré-hidrólise do efluente (101 dias – tempo total dos experimentos), realizou-se a medição da atividade do sólido do leito fixo, conforme mostra a Figura 20.

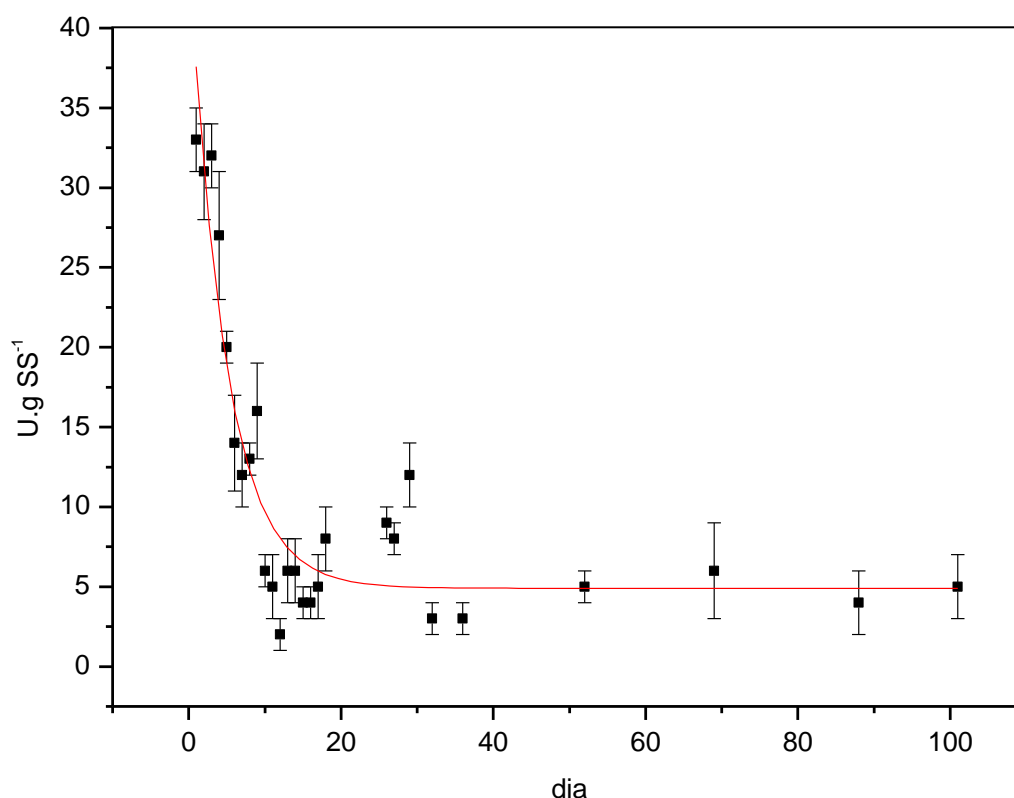


Figura 20. Atividade de lipase do sólido fermentado contido no leito fixo do biorreator ao longo do tratamento de pré-hidrólise do efluente de frigorífico. Linha de tendência com decaimento exponencial. Dosagem de atividade lipolítica pelo método titulométrico utilizando tricaprilina (C8) como substrato.

Observa-se na Figura 20 que houve diminuição na atividade de lipase no leito do biorreator devido, provavelmente, à dessorção da enzima com o clarificado. Esta diminuição foi bastante acentuada entre o 3º e o 6º dia de tratamento. Porém, após 9 dias de funcionamento do sistema de tratamento, a atividade de lipase do leito fixo estabilizou-se em $5,6 \pm 2,5 \text{ U.g SS}^{-1}$. Este resultado poderia ser devido à lipase produzida pelo próprio fungo ou à produção de atividade lipolítica por bactérias endógenas do efluente bruto. A hipótese de que *R. microsporus* permaneceu viável durante todos os experimentos foi explorada mais adiante, no item 5.3.4.

5.3.2. Período de Adaptação da Biomassa no Biorreator

Após o início da alimentação do biorreator com o efluente de frigorífico, notou-se uma fase de adaptação do sistema. Esta fase é identificada na Figura 21 através da diminuição de DQO e DBO, que atinge o seu mínimo após 16 dias, indicando eficiência máxima na remoção da matéria orgânica. Este comportamento indica estabilização da eficiência do sistema quanto à remoção de DQO e DBO, dada pela concentração destes parâmetros no efluente clarificado, considerando que este é um sistema que está sendo continuamente alimentado.

Desta forma, observa-se na Figura 21, para o experimento com o sólido fermentado, que a estabilização, tanto da DQO como da DBO no clarificado, ocorreu a partir do 16º dia, demonstrando o fim do processo de adaptação do sistema de tratamento de pré-hidrólise. Desta forma, a partir do 16º dia considerou-se o sistema em equilíbrio, e os experimentos que visavam à variação do tempo de retenção no biorreator tiveram início a partir desta data.

Aparentemente, analisando a Figura 21, o teste controle, utilizando o substrato esterilizado (autoclave), sem o inóculo de *R. microsporus*, foi mais eficiente que o sólido fermentado na remoção de DQO e DBO. Este teste controle apresentou um perfil de decaimento mais acentuado, com um período de adaptação mais curto: 7 dias frente aos 16 dias necessários aos experimentos com o sólido fermentado. O maior período de adaptação foi provavelmente devido à presença de *R. microsporus* no sólido fermentado, que leva mais tempo para se adaptar (tempo de crescimento fúngico é lento comparado ao bacteriano). Além disso, *R. microsporus* pode competir com as bactérias presentes no efluente e até mesmo inibir o crescimento destas, hipótese que será discutida no item 5.3.4.

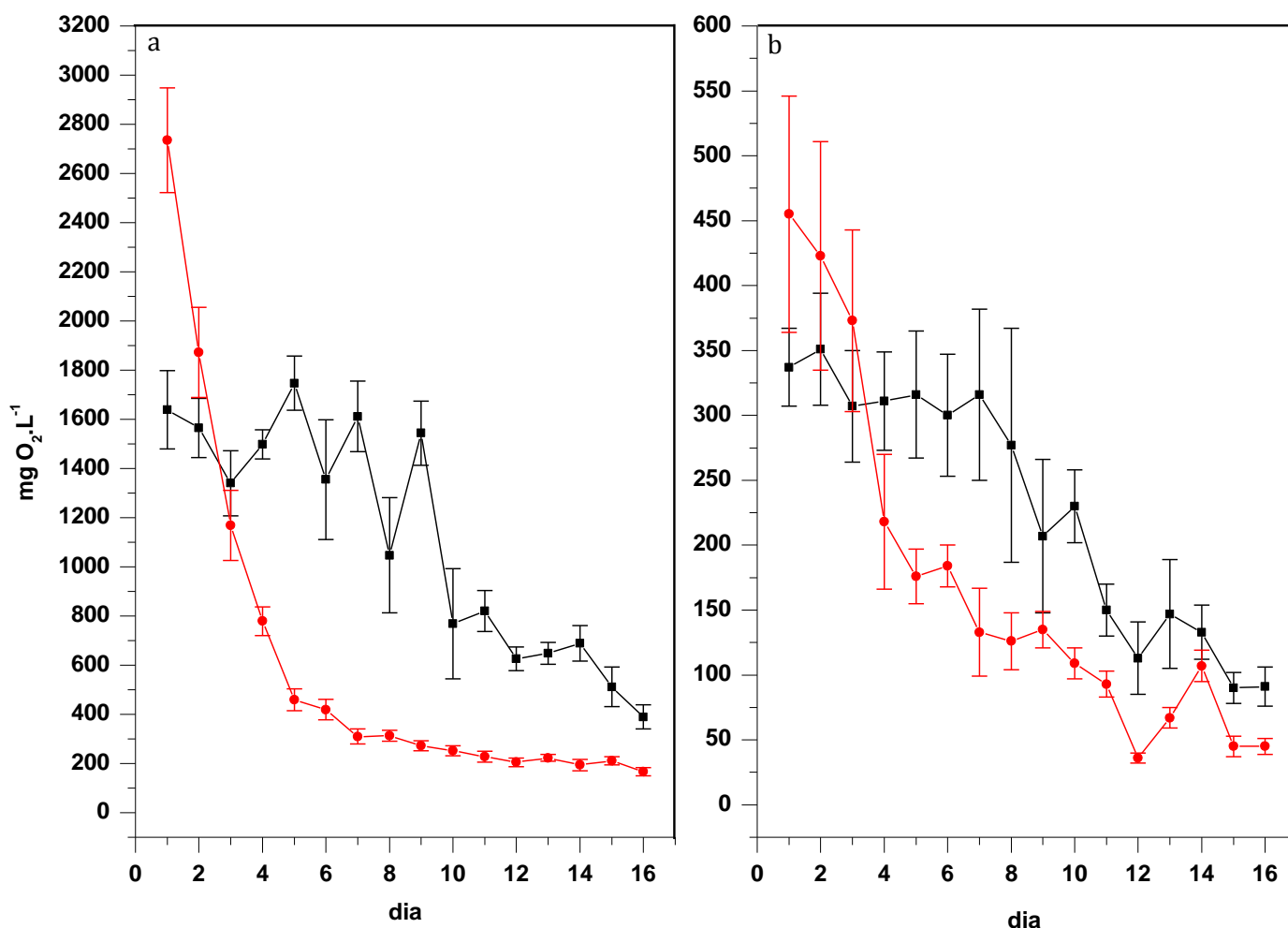


Figura 21. Período de adaptação da biomassa nos experimentos com o sólido fermentado (—■—) e no teste controle (—●—). a) Perfil de DQO no clarificado do biorreator. b) Perfil de DBO no clarificado do biorreator. Vazão de entrada 1 mL.min⁻¹, tempo de retenção 120 h.

Entretanto, observa-se na Figura 22 que a concentração de 605 mg.L⁻¹ de O&G no efluente bruto rapidamente caiu para 11 mg.L⁻¹ no clarificado (queda de 98%), logo após o 1º dia de tratamento de pré-hidrólise utilizando o sólido fermentado, enquanto que, no substrato sem o inóculo (teste controle) esta queda foi de apenas cerca de 50%. Este comportamento pode estar relacionado tanto ao fenômeno de adsorção dos lipídeos no bagaço de cana (filtração) quanto à atuação da lipase de *R. microsporus*. Nos experimentos com o sólido fermentado, a remoção dos lipídeos está provavelmente relacionada à sua utilização como fonte de carbono pelos microrganismos, pois, caso a biomassa não estivesse degradando os lipídeos, notar-se-ia um aumento contínuo na concentração de O&G no clarificado. Isto ocorreu no teste controle, onde se verificou um aumento do teor de O&G a partir do 10º dia de experimento, mostrando que os lipídeos,

neste caso, sofreram apenas um processo de adsorção física, e que depois da saturação do substrato foram arrastados com o efluente clarificado.

Desta forma, é possível afirmar que a lipase de *R. microsporus* foi a principal responsável pela degradação do O&G, já que na presença do sólido fermentado tal aumento no teor de O&G não foi observado.

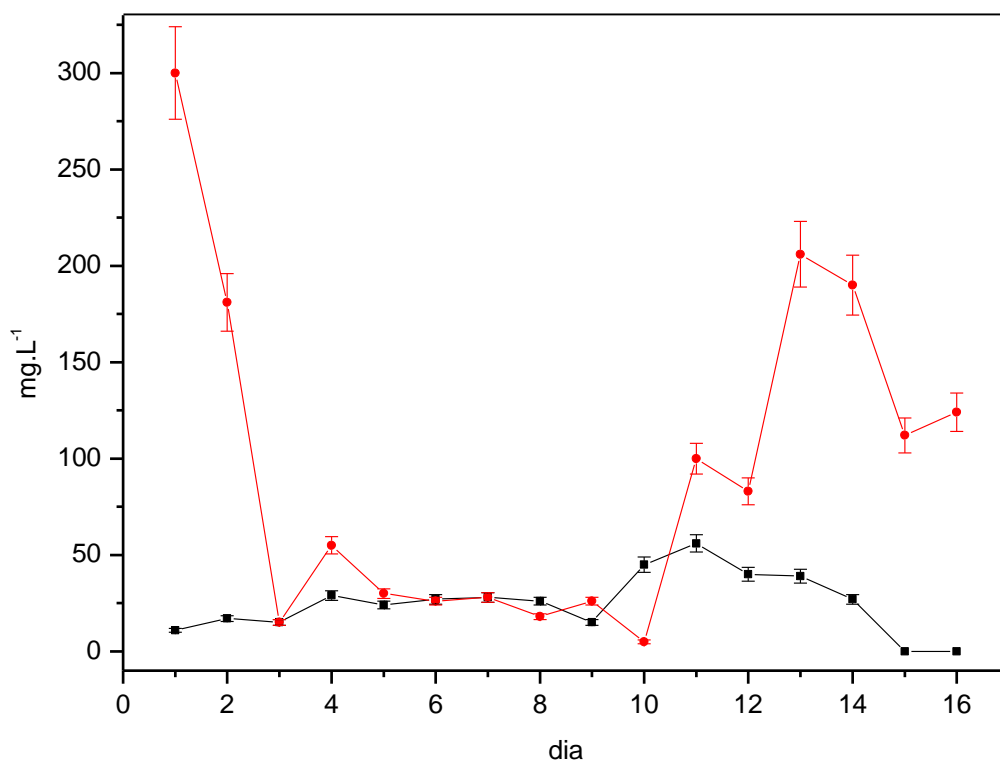


Figura 22. Perfil de óleos e graxas (O&G) no clarificado do biorreator, nos experimentos com o sólido fermentado (—■—) e no teste controle (—●—), durante o período de adaptação da biomassa. Vazão de entrada 1 mL.min⁻¹, tempo de retenção 120 h.

5.3.3. Eficiência na Remoção da DQO, DBO e Óleos e Graxas (O&G)

Ao longo dos experimentos, tanto com o sólido fermentado como o teste controle, monitorou-se diariamente o clarificado através de análises físico-químicas, conforme está mostrado na Figura 23, que descreve o comportamento dos parâmetros DQO e DBO. Os experimentos com o sólido fermentado e o teste controle seguiram sem interrupções por 101 e 37 dias respectivamente que tanto os experimentos com o sólido fermentado, como o teste controle, seguiram sem interrupções por 101 e 37 dias respectivamente.

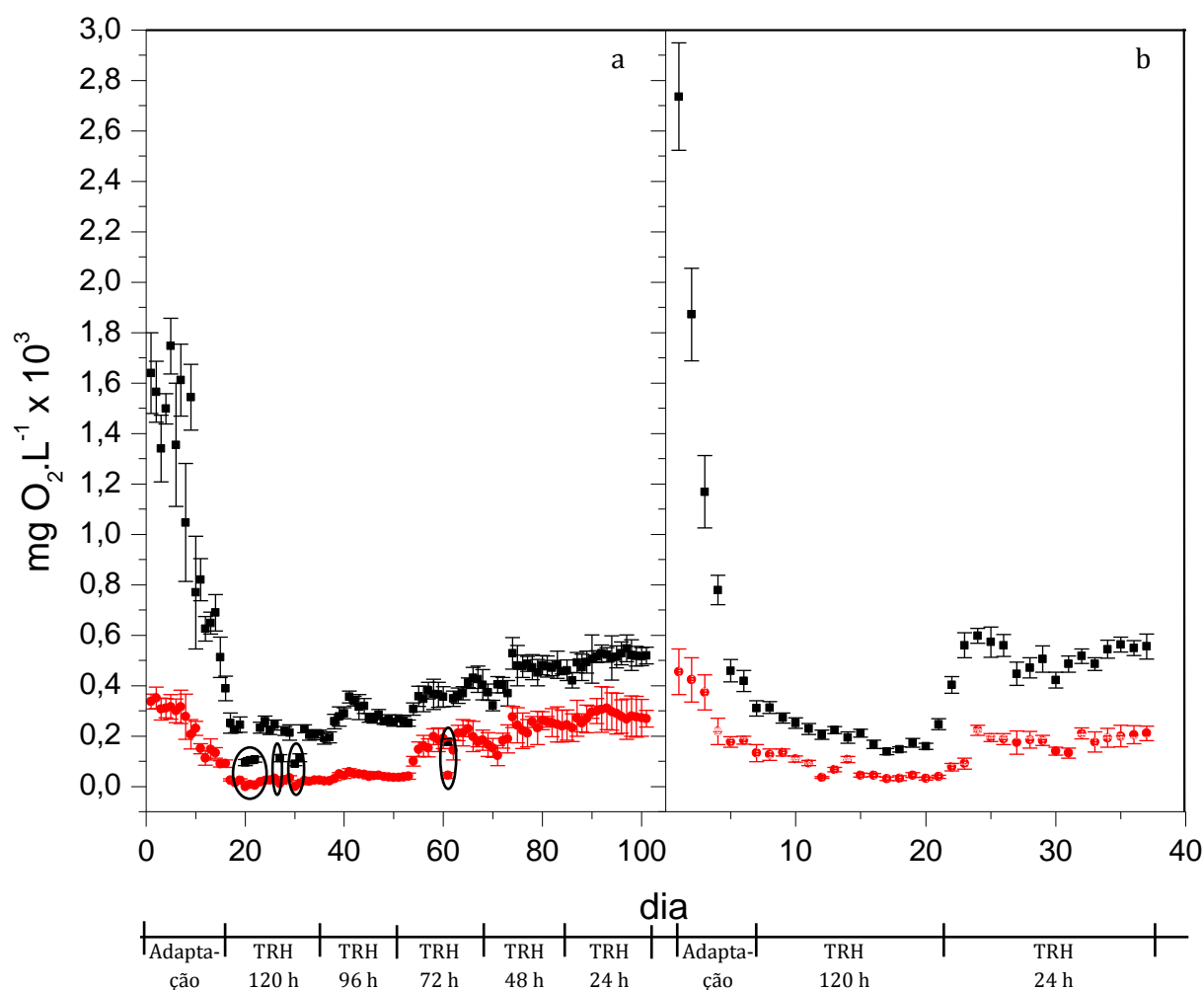


Figura 23. Monitoramento da DQO (■) e DBO (●) do clarificado ao longo dos 101 dias de experimentos. a) Experimentos com sólido fermentado. b) Teste controle. DQO no efluente bruto $2978 \pm 385 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$, DBO no efluente bruto $554 \pm 69 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$. Os pontos marcados com um círculo foram removidos para análise da eficiência do tratamento de pré-hidrólise. TRH – Tempo de Retenção Hidráulico.

Para a análise da eficiência do tratamento de pré-hidrólise enzimática, consideraram-se os seguintes fatores:

- Os pontos do gráfico marcados com um círculo (dias 20, 21, 22, 27, 30, 31 e 61) foram removidos, já que nestes experimentos ocorreram interrupções de aproximadamente 8 h na alimentação do biorreator devido ao entupimento da mangueira da bomba peristáltica;
- Os dois dias necessários à estabilização da DQO e DBO na transição de cada tempo de retenção não foram considerados, pois um novo equilíbrio no metabolismo dos microrganismos estava sendo estabelecido em resposta a um aumento na carga orgânica de entrada no biorreator;

Desta forma, a eficiência do biorreator, medida como porcentagem de remoção de DQO, DBO e O&G, no tratamento do efluente de frigorífico, foi determinada para cada tempo de retenção hidráulico (24 a 120 h equivalentes a vazões de 5,0 mL.min⁻¹ a 1,0 mL.min⁻¹).

A Tabela 5 traz os valores médios de DQO, DBO, DBO/DQO e O&G, bem como a eficiência na remoção destes, obtidos no clarificado para cada tempo de retenção no biorreator. Nota-se o aumento contínuo nas concentrações médias de DQO e DBO conforme diminuição do tempo de retenção, com conseqüente diminuição na eficiência do tratamento. Isto deve provavelmente à velocidade de metabolismo que a biomassa apresenta, já que nos maiores tempos de retenção (120 a 72 h) a carga aplicada de matéria orgânica é menor, facilitando o metabolismo microbiológico e aumentando a utilização do substrato. Além disso, com alta retenção hidráulica, o fenômeno de filtração também é muito significativo.

Observam-se na Tabela 5 reduções bastante significativas na DQO (cerca de 92%), principalmente com o maior tempo de retenção hidráulico (120 h). Comparando os valores de DQO nos tempos de retenção de 120 h e 24 h com os obtidos nos testes controle 120 h e controle 24 h, observa-se que a eficiência, pelo menos quanto à remoção da DQO, apresentou valores praticamente similares (91,5; 82,7; 93,0 e 82,6% respectivamente).

Já quanto ao comportamento da DBO, observa-se que, no controle 24 h, a DBO média do clarificado foi cerca de 34% menor que a obtida para o experimento análogo com o sólido fermentado (média de 187 frente a 283 mg O₂.L⁻¹). Isto foi provavelmente devido à maior concentração de O&G no clarificado do teste controle (média de 120 frente a 22 mg.L⁻¹), de forma que, devido a seu efeito recalcitrante, acabou por diminuir a fração biodegradável da matéria orgânica.

O comportamento da razão DBO/DQO (biodegradabilidade do efluente clarificado), para cada TRH adotado é mostrado na Figura 24, onde se observa que, com 120 e 96 h de TRH obteve-se um efluente com baixa biodegradabilidade (DBO/DQO média de 0,11 e 0,15 respectivamente). Este fenômeno é reportado na literatura e é considerado comum, já que, segundo Von Sperling (2005) sob alta utilização de substrato, a biomassa consome praticamente toda a matéria orgânica biodegradável, restando apenas a fração considerada de difícil degradação, seja por apresentar toxidez ou por apresentar alto índice de complexação. Da mesma forma, com tempos menores de retenção (24 e 48 h de TRH), a remoção da carga orgânica é menos eficiente, aproximando os valores de DBO dos da DQO.

Tabela 5. Variação da eficiência da pré-hidrólise enzimática do biorreator com sólido fermentado por *Rhizopus microsporus* para cada tempo de retenção hidráulico. Características do efluente bruto: DQO $2978 \pm 385 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, DBO $554 \pm 69 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, DBO/DQO 0,19 e O&G $603 \pm 3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

		Controle 120 h	120 h	96 h	72 h	48 h	24 h	Controle 24 h
DQO	Média ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	209 ± 51	225 ± 20	288 ± 32	378 ± 28	461 ± 38	515 ± 17	520 ± 52
	Eficiência (%)	93,0	91,5	90,3	87,3	84,5	82,7	82,6
DBO	Média ($\text{mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$)	68 ± 39	25 ± 5	44 ± 10	183 ± 26	237 ± 27	283 ± 17	187 ± 26
	Eficiência (%)	87,8	95,6	92,1	67,0	57,3	49,0	66,3
DBO/DQO	Média	$0,31 \pm 0,13$	$0,11 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,03$
O&G	Média ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	106 ± 66	21 ± 25	49 ± 20	19 ± 20	28 ± 19	22 ± 12	120 ± 14
	Eficiência (%)	79,0	95,9	90,3	96,2	94,5	95,7	76,2

Também é observado na Figura 24 que o teste controle com 120 h de retenção apresentou grandes oscilações na relação DBO/DQO, que podem ser explicadas pelas variações acentuadas no teor de O&G no clarificado, conforme será discutido em seguida. O controle com 24 h de retenção apresentou menores relações DBO/DQO (média de 0,36) frente aos experimentos com o sólido fermentado com 24, 48 e 72 h de retenção (DBO/DQO média de 0,55; 0,51 e 0,48 respectivamente), fenômeno que também pode ser explicado pelos altos teores de O&G no efluente clarificado.

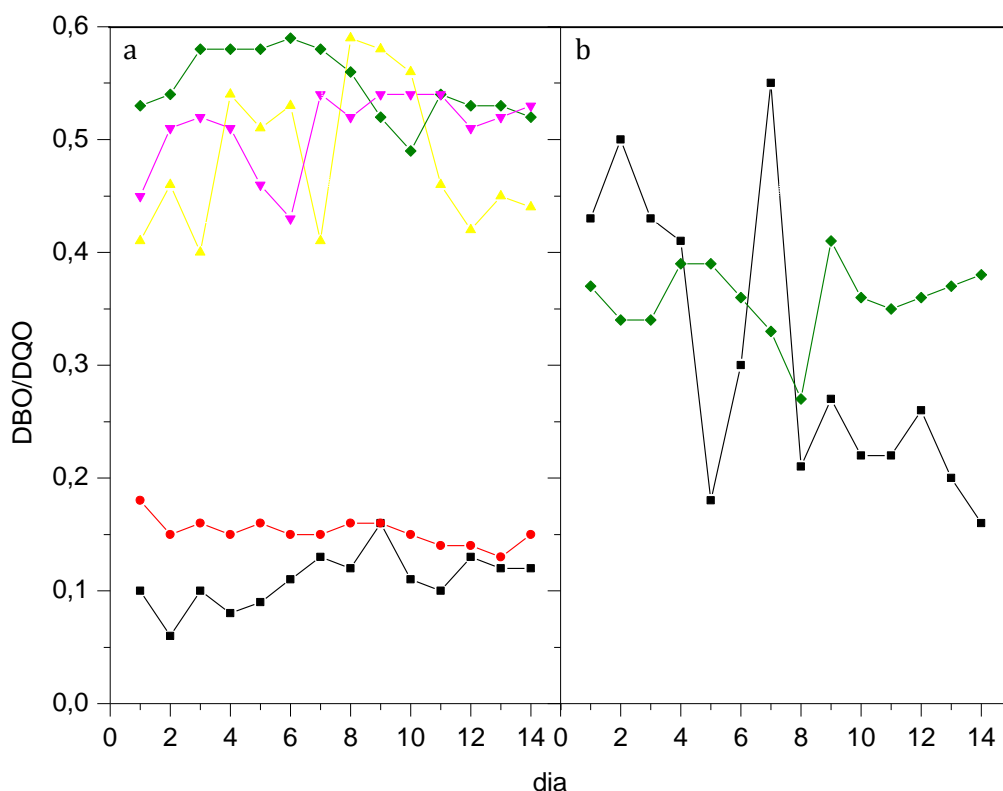


Figura 24. Relação DBO/DQO no efluente clarificado do biorreator. a) Experimentos com sólido fermentado para tempos de retenção hidráulicos de 120 h (—■—), 96 h (—●—), 72 h (—▲—), 48 h (—▼—) e 24 h (—◆—). b) Teste controle para tempos de retenção hidráulicos de 120 h (—■—) e 24 h (—◆—). Relação DBO/DQO média nas coletas do efluente bruto 0,19.

A razão DBO/DQO do efluente bruto foi de 0,19, indicando que o efluente é muito recalcitrante. Como ilustrado na Figura 24, após o tratamento de pré-hidrólise com 72, 48 e 24 h de TRH no reator, esta razão aumentou significativamente no clarificado, atingindo um mínimo de 0,40 e um máximo de 0,59. Isto mostra que o efluente tornou-se mais biodegradável. Provavelmente o aumento na biodegradabilidade, que não ocorreu no teste controle, mas que foi observada nos experimentos com o sólido fermentado, deve-se à atuação de lipases produzidas por *R. microsporus*, que, ao realizarem a hidrólise dos lipídeos, promovem a liberação de mono e diacilgliceróis, glicerol ou ácidos graxos

livres (dependendo do tipo e tamanho da cadeia carbônica do lipídeo). Estes compostos, de cadeia menos complexa, são absorvidos e metabolizados dentro da célula microbiana, não permanecendo adsorvidos à membrana ou parede celular, e, por consequência, não dificultando a difusão de OD para o interior da célula. Desta forma, uma fração dos compostos que tornava o efluente recalcitrante é degradada, aumentando sensivelmente a biodegradabilidade, e aproximando o teor de DBO ao da DQO (aumentando a razão DBO/DQO).

A variação no tempo de retenção do biorreator para os experimentos com o sólido fermentado (Tabela 5) não mostrou grande influência sobre a eficiência na remoção de O&G, obtendo-se valores entre 90 e 96% de remoção. Estes resultados estão mais bem representados na Figura 25, que descreve o perfil de variação do teor de O&G no efluente durante os experimentos. Observa-se uma grande variação nos resultados, tanto com o sólido fermentado como no teste controle. Porém, nota-se que as médias os teores de O&G obtidos nos experimentos com o sólido fermentado ($28 \pm 12 \text{ mg.L}^{-1}$) foram bem menores que as obtidas no controle ($113 \pm 10 \text{ mg.L}^{-1}$), mostrando novamente a atuação da lipase na degradação destes lipídeos. Além disso, a oscilação observada no teor de O&G no controle com 120 h de retenção é oposta à curva da relação DBO/DQO para o mesmo experimento (Figura 24). Ou seja, as amostras que apresentaram menores teores de O&G foram mais biodegradáveis (maior relação DBO/DQO), e vice-versa, reforçando que a variação nas relações DBO/DQO estava intimamente relacionada à remoção de O&G.

Os resultados descritos na Figura 25 podem ser interessantes para o escalonamento do processo para escala industrial, pois, sendo o objetivo principal o aumento da biodegradabilidade pela hidrólise no teor de O&G, menores tempos de retenção podem ser adotados, o que leva a biorreatores de dimensões mais compactas.

Os grandes desvios obtidos nos teores de DQO, DBO e O&G descritos na Tabela 5 devem-se à característica intrínseca dos sistemas biológicos de tratamento. Segundo Beck (1986), estas variações acentuadas resultam da própria dinâmica do sistema, que apresenta (a) não linearidades, (b) amplas faixas de variação de constantes cinéticas, (c) biomassa heterogênea metabolizando um substrato heterogêneo, (d) imprecisão e (e) estabilidade interrompida por falhas abruptas. Porém, o ponto principal a ser observado é que a eficiência do tratamento enzimático foi superior ao teste controle principalmente quanto à redução no teor de O&G (cerca de 20% maior), objetivo principal deste trabalho.

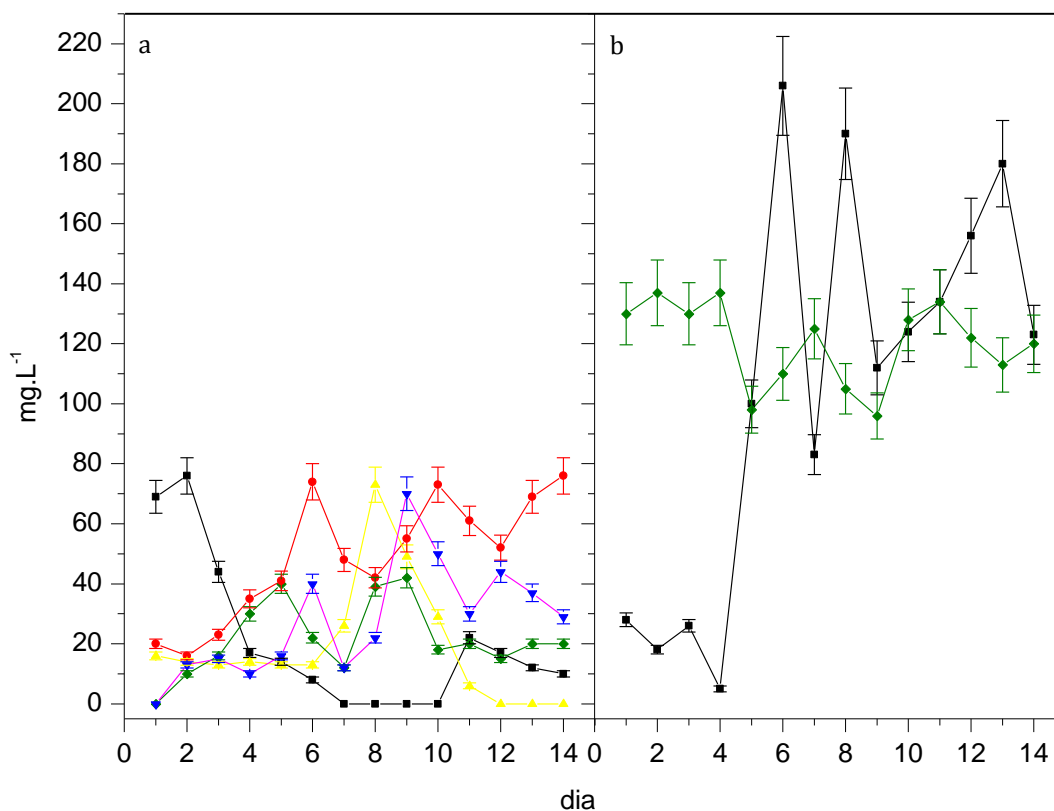


Figura 25. Perfil da variação da concentração de óleos e graxas (O&G) no efluente clarificado do biorreator. a) Experimentos com sólido fermentado para tempos de retenção hidráulicos de 120 h (—■—), 96 h (—●—), 72 h (—▲—), 48 h (—▼—) e 24 h (—◆—). b) Teste controle para tempos de retenção hidráulicos de 120 h (—■—) e 24 h (—◆—). Concentração de média de óleos e graxas nas coletas do efluente bruto $603 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}$.

5.3.4. Identificação e Isolamento de *Rhizopus microsporus* ao final dos experimentos

Para confirmar a hipótese de que os resultados obtidos neste trabalho podem ser atribuídos à ação do sólido fermentado por *R. microsporus* contido no biorreator, realizou-se a inoculação de alíquotas deste sólido em ágar PDA, tanto na presença como na ausência de antibiótico cloranfenicol, adicionado para inibir o crescimento bacteriano. Para tanto, uma alíquota de sólido do biorreator foi coletada no 96º dia de experimentos de pré-hidrólise do efluente (sendo que o tempo total de experimento foi de 101 dias) e inoculada nas placas de Petri. A Figura 26 mostra o aspecto das placas após incubação por 5 dias a 30 °C .

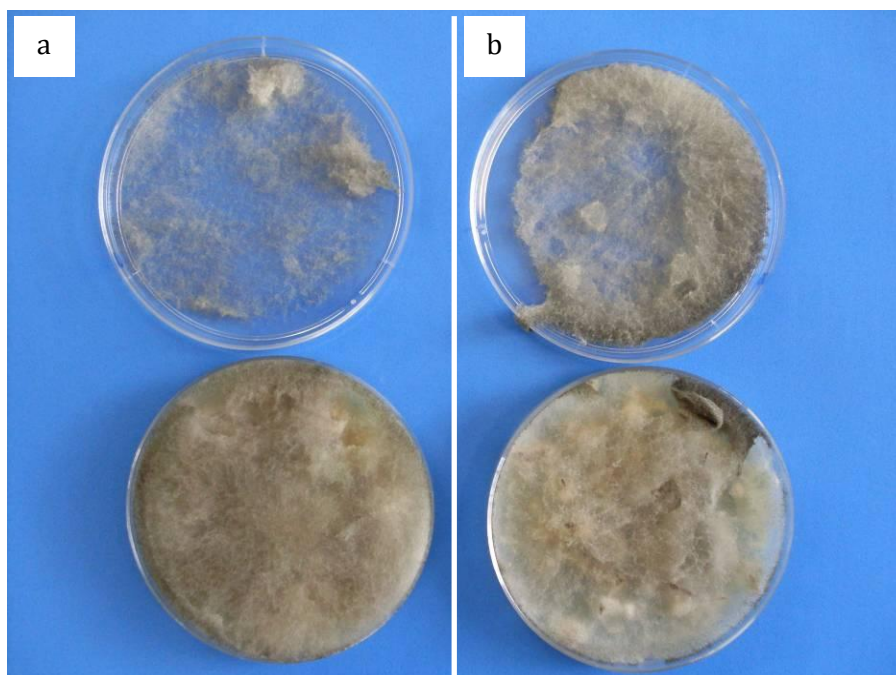


Figura 26. Crescimento de *Rhizopus microsporus* após incubação por 5 dias a 30 °C de alíquota do sólido retirado do biorreator após 96 dias de tratamento do efluente. Placas de Petri abertas, acima a tampa e abaixo a placa em si. a) Inoculação em ágar PDA 39 g.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol. b) Inoculação em ágar PDA 39 g.L⁻¹.

Observa-se na Figura 26 o crescimento de micélios aéreos (atingindo a tampa da placa de Petri), de textura de algodão e esporos escuros de coloração marrom-acinzentada, características típicas de *R. microsporus* (GEFOR, 2010). Pode-se observar também que visualmente não houve diferença significativa no crescimento de *R. microsporus* na presença ou na ausência de cloranfenicol, mostrando que, mesmo competindo com as bactérias existentes no efluente bruto, o fungo foi capaz de desenvolver-se no sólido do biorreator. Observa-se também que *R. microsporus* inibiu o crescimento das bactérias no ágar PDA, já que não foi notada a formação típica de halos de colônias bacterianas na placa onde não foi adicionado o cloranfenicol (Figura 26b).

Visando à confirmação destes resultados, foi realizada uma microscopia óptica em ambas as placas de Petri, conforme mostra a Figura 27. Observa-se a formação de esporângios pequenos, de haste curta e com columelas semi-esféricas. Estas características, segundo Polizeli *et al.* (2006) *apud* Schipper *et al.* (1985), são típicas de *R. microsporus*. Também não foi notada diferença visualmente significativa na microscopia realizada nos fungos que cresceram na presença ou na ausência de cloranfenicol, mostrando que em ambos os casos trata-se do mesmo microrganismo.

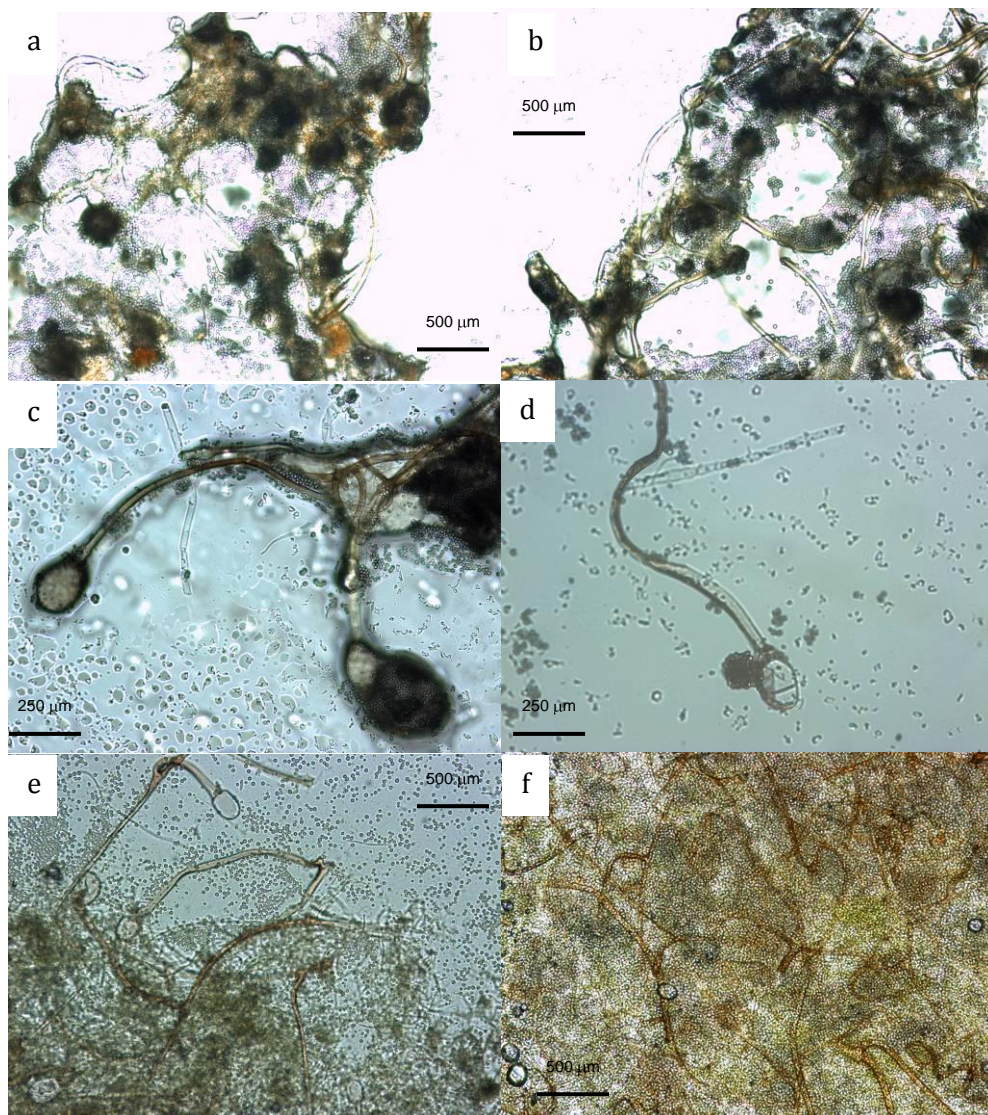


Figura 27. Microscopia óptica de *Rhizopus microsporus*. a) Crescimento na presença de cloranfenicol, b) Crescimento na ausência de cloranfenicol, c) Detalhe dos esporângios eclodido (esquerda) e com esporos (direita), d) Esporângio liberando esporos, e) Esporângios eclodidos e micélio, f) Hifas e micélio.

Sendo assim, pode-se afirmar que a hidrólise dos lipídeos existentes no efluente bruto foi ocasionada, na maior parte, devido à atuação das lipases produzidas por *R. microsporus*, já que este fungo é capaz de competir com as bactérias deste efluente e realizar seu metabolismo.

No 36° dia do teste controle (com duração total de 37 dias), também foi coletada uma alíquota do sólido do biorreator, que foi inoculada em ágar PDA, tanto na presença como na ausência de antibiótico cloranfenicol, por 5 dias a 30 °C, conforme mostra a Figura 28. Observa-se a formação de pequenos halos bacterianos e crescimento de hifas em ambas as placas, provindos da microflora endógena do efluente bruto. Comparando este resultado com as baixas eficiências na remoção de O&G obtidas no teste controle, admite-se que os microrganismos endógenos do efluente, embora capazes de se

desenvolver no biorreator, não possuem a mesma capacidade de degradação de O&G que *R. microsporus* apresentou.

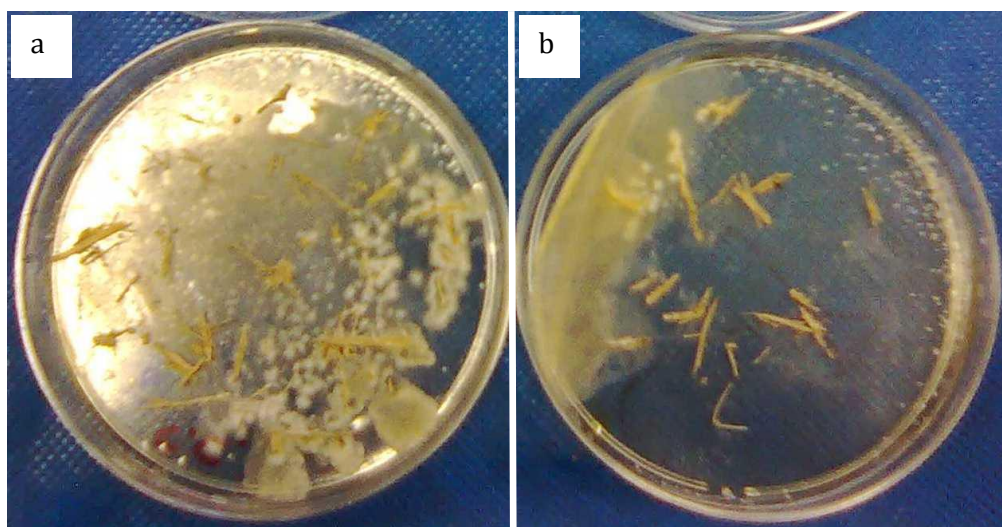


Figura 28. Crescimento de microrganismos endógenos do efluente bruto após incubação de 5 dias a 30 °C de alíquota do sólido retirado do biorreator. a) Inoculação em ágar PDA 39 g.L⁻¹ e 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol. b) Inoculação em ágar PDA 39 g.L⁻¹.

5.4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

A diminuição na atividade lipolítica no sólido do biorreator e a alta eficiência na remoção de O&G (acima de 90%), ao longo dos 101 dias de experimentos, pode confirmar o que foi observado por Diyorov *et al.* (1994) quanto à localização das lipases produzidas por *R. microsporus*. A diminuição da atividade de lipase pode estar relacionada à desorção das lipases secretadas no meio extracelular. Porém, a alta remoção de O&G pode estar relacionada tanto a atuação das lipases intracelulares como das extracelulares, da seguinte forma:

- Embora tenha ocorrido diminuição na atividade de lipase no leito do biorreator, a alta hidrólise de O&G pode ter sido provocada pela atuação das lipases intracelulares, que não iriam aparecer na análise de atividade lipolítica do sólido fermentado, já que não estavam na forma excretada;
- Dado o crescimento contínuo do fungo no sólido do biorreator ao longo dos 101 dias de experimentos, e dada a manutenção da atividade de lipase em 5,6 U.g SS⁻¹ no leito do biorreator, as lipases extracelulares continuaram a ser produzidas, já que foram identificadas no teste de atividade de lipase contra a tricaprilina. Desta forma, contribuiriam também para a manutenção da alta hidrólise de O&G.

Embora a hidrólise dos O&G forme ácidos graxos livres, conforme Figura 15, caso houvesse acúmulo destes ácidos ao longo do tratamento de pré-hidrólise, seria notado também uma queda no pH do efluente clarificado. Este fato não foi observado ao longo dos 101 dias de experimentos, já que a variação do pH do clarificado manteve-se entre 6,8 e 7,3 (item 5.3). Esta faixa de pH relativamente neutra mostra que, após a hidrólise do O&G, *R. microsporus* provavelmente foi capaz de consumir os ácidos livres formados, utilizando-os como fonte de carbono para suas funções metabólicas.

Comparando os resultados obtidos com os estudos mais recentes de tratamento enzimático para efluentes oleosos, observam-se semelhanças nos fenômenos relatados, bem como inovações do presente trabalho frente aos demais, conforme descrito a seguir.

Durli (2007) atingiu 100% de eficiência na remoção da DQO e DBO após tratamento aeróbico prolongado por 7 dias (teste de Zahn-Wellens) de um efluente oleoso pré-hidrolisado pela adição do sólido fermentado por *B. cepacia*. Neste estudo, embora o pós tratamento aeróbico aplicado seja um teste empírico, o mesmo tratamento quando realizado no efluente não pré-hidrolisado apresentou uma cinética de degradação mais lenta (9 dias) para atingir 100% de remoção na DQO e DBO. Este resultado foi atribuído à menor carga orgânica presente no efluente pré-hidrolisado, devido à hidrólise de O&G pela lipase presente no sólido fermentado, que forma ácidos livres, mais facilmente assimilados pelos microrganismos presentes na etapa de pós tratamento adotada.

Valladão *et al.* (2007) avaliaram a eficiência do pré-tratamento enzimático (adição de sólido fermentado por *P. restrictum*) pela avaliação de ácidos graxos livres formados após o tratamento e a geração de biogás após o tratamento anaeróbico de efluente pré-hidrolisado. Neste estudo, os autores observaram o aumento na formação de biogás no tratamento do efluente pré-hidrolisado. Este resultado foi atribuído à hidrólise dos lipídeos, que ocasionaram redução no teor de O&G, aumentando a razão DBO/DQO do efluente pré-hidrolisado. Tais resultados são semelhantes aos observados por Rosa *et al.* (2009) e no presente trabalho, já que se observou o aumento da biodegradabilidade do efluente (razão DBO/DQO) nos tempos de retenção hidráulico de 24 a 72 h.

O estudo de Damasceno *et al.* (2008) consistiu na adição direta do sólido fermentado em um sistema de lodos ativados de bancada, visando avaliar o comportamento do tratamento biológico assistido pela adição do preparado enzimático e sob choques de carga de O&G. Neste estudo, os autores observaram que a adição do sólido fermentado no lodo ativado foi capaz de manter uma alta eficiência na remoção da DQO, mesmo na presença de choques de carga de O&G. Desta forma, a adição do sólido fermentado previne a formação de *bulking* filamentoso e morte excessiva de biomassa, já que a hidrólise de O&G leva à formação de ácidos livres que não se aderem à parede celular dos microrganismos, e nem tampouco forma películas sobre os flocos de

lodo. No presente estudo, a mesma afirmação pode ser feita, já que se observou concentrações de O&G abaixo de 80 mg.L^{-1} em todas as amostras do efluente de saída do biorreator (clarificado).

Rigo *et al.* (2008) objetivaram um estudo comparativo entre a pré-hidrólise de um efluente de elevado teor de O&G com enzima comercial (Lipolase 100T) e com a adição de sólido fermentado por *P. restrictum*, utilizando um reator anaeróbico em escala de bancada como tratamento subsequente. Neste estudo, os autores observaram a formação de ácidos livres em excesso quando a pré-hidrólise foi realizada com a enzima comercial, o que ocasionou abaixamento excessivo de pH, diminuição da biodegradabilidade do efluente e conseqüente diminuição da eficiência do tratamento anaeróbico. Este resultado foi atribuído à maior atividade lipolítica da enzima comercial frente ao sólido fermentado, que apresentou aumento na biodegradabilidade do efluente e conseqüente aumento na eficiência do tratamento anaeróbico. Tal fenômeno já havia sido observado por Jeganathan *et al.* (2007), que também utilizaram uma lipase comercial na pré-hidrólise de efluente oleoso precedido de tratamento anaeróbico. No entanto, conforme observado no presente trabalho, o crescimento do fungo no leito do biorreator provavelmente é responsável pelo consumo dos ácidos livres formados, já que se observou a redução da DQO, DBO e O&G do efluente, acompanhada de aumento na biodegradabilidade (em tempos de retenção hidráulicos de 24 a 72 h).

No estudo de Alberton *et al.* (2010), que também utilizaram a lipase de *R. microsporus* (produzida por FES), porém tratando um efluente de laticínio esterilizado (autoclave) em bateladas de 120 h, adotando 0,3% m/v de sólido fermentado/efluente, os autores obtiveram redução no teor de O&G no efluente tratado de 91% sem etapa subsequente de tratamento. Além disso, estes autores adotaram um efluente com maiores teores de DQO (entre 6000 e 7000 $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$) e maiores concentrações de O&G (entre 1000 e 1500 mg.L^{-1}). Desta forma, comparando-se os resultados obtidos por estes autores com o presente estudo, observa-se que a eficiência na remoção de O&G do tratamento enzimático mostrou-se próxima (90 a 96%) também sem a necessidade de pós tratamento. Isto mostra o grande potencial da lipase de *R. microsporus* na tecnologia enzimática para tratamento de efluentes oleosos, já que o presente estudo utilizou a mesma lipase, produzida pela mesma metodologia, porém tratando um efluente não esterilizado, em fluxo contínuo, e ao longo de 101 dias ininterruptos de experimentos.

A Tabela 6 compara as características e a eficiência do tratamento enzimático realizado no presente trabalho com outros citados na literatura, onde se observam algumas diferenças, principalmente quanto à não utilização de pós tratamento (etapa subsequente de remoção da matéria orgânica) após a pré-hidrólise. O uso de um

biorreator empacotado com o sólido fermentado, ao invés da adição de pequenas quantidades de sólido fermentado, também é outra diferença significativa.

Porém, três fatores impedem a comparação direta entre os resultados deste trabalho com os demais descritos na Tabela 6. Inicialmente, o tipo de tratamento adotado é diferente dos demais, pois utiliza um biorreator empacotado com o sólido fermentado, e não a adição de pequenas proporções de sólido fermentado diretamente ao efluente bruto. Desta forma, não é possível estabelecer qual a proporção em m/v de sólido fermentado/efluente adotado, dado que se utilizou um sistema de fluxo contínuo. A forma como foi analisada a eficiência do tratamento também impede comparações diretas, já que os estudos descritos na Tabela 6 adotaram apenas o monitoramento da formação de ácidos livres após a pré-hidrólise, medindo a DQO e/ou DBO do efluente tratado somente após a aplicação de uma etapa clássica de tratamento (exceto o estudo de Alberton *et al.* 2010). Por fim, os diversos estudos mostrados na Tabela 6 utilizaram efluentes diferentes do adotado no presente trabalho, impossibilitando uma comparação direta entre a eficiência do tratamento obtido.

Visando à aplicação deste processo na indústria, a elevada eficiência de tratamento (alta remoção de matéria orgânica) mostra-se interessante, pois com altas reduções de DQO, DBO e O&G apenas com o tratamento de pré-hidrólise, a etapa subsequente de pós tratamento deste efluente ficará mais simples e compacta, já que a carga orgânica aplicada sobre ela será menor. Além disso, segundo Von Sperling (2005) e Metcalf & Eddy (2003), sistemas com estas características apresentam menores custos de implantação, operação, gasto de energia e menor geração de lodo. Desta forma, sugere duas formas possíveis de utilização do biorreator:

- Como etapa principal de tratamento do efluente : neste caso, o biorreator deve operar com 120 a 96 h de retenção hidráulica, já que nestes casos a remoção na DQO, DBO e O&G permaneceu acima de 90%, praticamente atingindo o limite de emissão da resolução CEMA 070/09 (exceto pelo limite de 200 mg.L⁻¹ de DQO). Desta forma, uma etapa subsequente de baixo custo e pouca geração de lodo pode ser capaz de atingir o limite de DQO estabelecido pela mesma legislação, tais como uma lagoa de maturação, zona de raízes ou coagulação de polimento;
- Como etapa de pré tratamento do efluente : neste caso, o biorreator deve operar com 24 h de retenção hidráulica, já que o objetivo não mais é remover com alta eficiência a matéria orgânica, e sim hidrolisar O&G para tornar o efluente mais biodegradável. Desta forma, uma etapa subsequente clássica, como lodos ativados, seria capaz de realizar o tratamento final do efluente agora mais biodegradável.

Tabela 6. Características e eficiências dos sistemas de tratamento enzimático de pré-hidrólise de efluente de elevada concentração de óleos e graxas (O&G) (continua).

	Presente trabalho	Durli (2007)	Valladão <i>et al.</i> (2007)	Damasceno <i>et al.</i> (2008)	Rigo <i>et al.</i> (2008)	Rosa <i>et al.</i> (2009)	Alberton <i>et al.</i> (2010)
Tipo de tratamento de pré-hidrólise	Fluxo contínuo. Biorreator para 0,06 a 0,3 L/h empacotado com o sólido fermentado.	Bateladas de 24 a 48 h. Frascos Erlenmeyer com 0,3 L de efluente. Adição de pequenas porções do sólido fermentado sob agitação.	Bateladas de 22 h. Frascos Erlenmeyer com 0,4 L de efluente. Adição de pequenas porções do sólido fermentado sob agitação.	Fluxo contínuo. Lodos ativados em bancada com 0,14 L/h. Adição de pequenas porções do sólido fermentado sob agitação.	Bateladas de 24 h. Frascos Erlenmeyer com 0,09 L de efluente. Adição de pequenas porções do sólido fermentado e enzima comercial ¹ sob agitação.	Bateladas de 24 h. Recipiente com 18 L de efluente. Adição de pequenas porções do sólido fermentado sob agitação.	Bateladas de 12 a 120 h. Frascos Erlenmeyer com 0,07 L de efluente. Adição de pequenas porções do sólido fermentado sob agitação.
Proporção sólido fermentado/efluente (m/v)	---	0,1%	0,1 a 1%	0,1%	0,1 e 5%	0,1%	0,3%
Microrganismo produtor da lipase	<i>R. microsporus</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>P. restrictum</i>	<i>P. restrictum</i>	<i>P. restrictum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>R. microsporus</i>

Tabela 6 (continuação). Características e eficiências dos sistemas de tratamento enzimático de pré-hidrólise de efluente de elevada concentração de óleos e graxas (O&G).

	Presente trabalho	Durli (2007)	Valladão <i>et al.</i> (2007)	Damasceno <i>et al.</i> (2008)	Rigo <i>et al.</i> (2008)	Rosa <i>et al.</i> (2009)	Alberton <i>et al.</i> (2010)
Remoção máxima de DQO	91,5% sem pós tratamento	100% após tratamento aeróbico prolongado	83% após tratamento anaeróbico	90% após tratamento aeróbico	85% após tratamento anaeróbico tanto com adição de sólido fermentado e lipase comercial	90% após tratamento anaeróbico	Não avaliado
Remoção máxima de DBO	95,6% sem pós tratamento	100% após tratamento aeróbico prolongado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado
Remoção máxima de O&G	96,2% sem pós tratamento	82% sem pós tratamento prolongado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado	91% sem pós tratamento

(1) Lipolase 100T, Novozymes.

É importante ressaltar que o presente estudo apresenta inovações ainda não reportadas na literatura, como o uso de um biorreator aeróbico de fluxo contínuo e empacotado com o sólido fermentado. Estas características podem permitir uma ampliação de escala do processo de tratamento, visto que:

- A grande quantidade de inóculo de fungo presente na massa de sólido empacotada no biorreator facilita a adaptação e a competição com as bactérias endógenas do efluente;
- A especificidade do fungo em produzir uma alta atividade lipolítica fornece uma vantagem competitiva sobre as bactérias endógenas do efluente, também facilitando sua adaptação;
- O empacotamento do biorreator com o sólido fermentado, por consequência a presença da lipase e do micélio do fungo no sólido, assistido pela injeção de ar (biorreator aeróbico) permite que o fungo cresça e se desenvolva no biorreator, não havendo a necessidade de reposição ou troca do biocatalisador contido no leito fixo. Isto é possibilitado pela presença de oxigênio dissolvido, bem como das fontes de carbono e de nutrientes provindas do efluente bruto, que fornecem as necessidades básicas ao metabolismo do fungo;
- O crescimento contínuo do fungo no sólido empacotado no biorreator provoca uma alta redução na DQO, DBO e O&G, já que o microrganismo utiliza a matéria orgânica do efluente como fonte de alimento (consumo dos ácidos livres liberados pela hidrólise do O&G e demais fontes carbonáceas presentes no efluente).

Desta forma, o biorreator preenchido com o sólido fermentado apresenta características de sistemas de tratamento com crescimento fixo, tal qual um biofiltro, já que é capaz de realizar o tratamento do efluente através do próprio metabolismo da biomassa aderida em seu leito. Porém, neste caso, o referido biofiltro apresenta uma finalidade mais específica, que é a remoção de O&G. Isto se mostra bastante inovador, já que os trabalhos descritos na literatura não apresentam estas características, pois consistem em adicionar continuamente porções de sólido fermentado no efluente, objetivando apenas a hidrólise de O&G pelas lipases, sem preocupar-se com o desenvolvimento do microrganismo responsável pela produção da lipase no sistema de pré-hidrólise. A exceção está no estudo de Alberton *et al.* 2010, que observaram o crescimento de *R. microsporus* no efluente durante as bateladas de experimentos.

Sendo assim, o processo aqui estudado potencialmente aproxima-se mais da realidade industrial, pois propõe um tratamento biológico de fluxo contínuo, possibilitando

o crescimento do microrganismo responsável pela produção da lipase no sistema de tratamento, além de utilizar um sólido fermentado de baixo custo de produção.

Embora ao longo dos 101 dias de experimentos com o sólido fermentado não tenha sido observado arraste de flocos de biomassa com o efluente clarificado (aglomerados de sólidos e microrganismos), este fenômeno é comum aos sistemas de tratamento biológico de crescimento fixo, tais como biofiltros, filtros biológico rotativos ou lodos ativados com biodisco, e é devido a saturação do leito que inexoravelmente ocorre ao longo do tempo de operação (Metcalf & Eddy, 2003). Além disso, embora também não tenha sido analisada neste estudo, a morte de microrganismos também é inerente a esta forma de tratamento, devido ao ciclo de vida limitado dos microrganismos (Von Sperling, 2005). No entanto, assim como é realizado em sistemas de biofiltração e filtros biológico rotativos, os flocos de biomassa arrastados com o clarificado podem ser facilmente sedimentados pela aplicação da decantação secundária, que permite também a recirculação da biomassa arrastada para o biorreator, bem como o seu descarte, caso o teor de SSF no sólido de fundo do decantador acuse alta idade do lodo (GRADY *et al.*, 1999).

6. CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver o processo de tratamento contínuo de um efluente de frigorífico utilizando um biorreator de leito fixo preenchido com o sólido fermentado com atividade lipolítica produzido por *R. microsporus*. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, as seguintes conclusões podem ser obtidas:

O tratamento contínuo de pré-hidrólise enzimática promoveu o abatimento na carga de O&G do efluente de frigorífico utilizado, visto que a eficiência na remoção deste parâmetro foi superior à obtida no teste controle. Isto mostra que a lipase produzida por *R. microsporus* é capaz de hidrolisar os lipídeos do efluente estudado com uma velocidade satisfatória. Da mesma forma, a pré-hidrólise enzimática mostrou-se vantajosa em relação ao aumento na biodegradabilidade do efluente tratado, podendo facilitar operação de unidades biológicas de tratamento subsequentes que possam existir na indústria.

A cepa de *R. microsporus* utilizada mostrou-se promissora, tanto pela eficiência atingida no tratamento quanto na resistência demonstrada frente à competição com bactérias por substratos orgânicos. Esta característica, somada à presença de lipases no sólido mesmo depois de cerca de 100 dias de experimento, é interessante do ponto de vista da aplicação em larga escala do processo. Para isto, também se faz necessária uma avaliação de viabilidade econômica, no que tange à produção do sólido fermentado em escala industrial e ao processo contínuo de hidrólise enzimática de efluentes com elevados teores de lipídeos.

Embora ocorra a dessorção da lipase com o efluente clarificado, o crescimento do fungo no leito fixo faz com que a atividade enzimática no biorreator seja estabilizada, mantendo a eficiência do tratamento e reforçando a não necessidade de reposição ou troca do leito fixo. Desta forma, o tratamento proposto apresenta potencial utilização em larga escala, já que se assemelha a um processo de tratamento biológico de crescimento fixo (biofiltro), que há décadas já é utilizado nos mais variados tipos de indústrias.

7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos, bem como das conclusões estabelecidas, tem-se como perspectivas futuras para este trabalho os seguintes pontos:

Estabelecer as constantes cinéticas de Monod, tais como taxa de consumo de substrato, taxa e crescimento específico, constante de saturação de substrato e constante de metabolismo endógeno no biorreator preenchido com o sólido fermentado por *R. microsporus*, visando aprimorar os métodos matemáticos de dimensionamento deste biorreator.

Ampliar a escala de produção do sólido fermentado por *R. microsporus*, possibilitando o posterior uso deste sólido em um biorreator de maiores dimensões, também permitindo, desta forma, a ampliação da escala do processo de pré-hidrólise enzimática de efluentes de elevado teor lipídico.

Realizar um estudo econômico visando avaliar a viabilidade do processo de produção do sólido fermentado por *R. microsporus* em larga escala, bem como a viabilidade do processo de pré-hidrólise enzimática para o tratamento de efluentes em uma indústria.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAFIGO – Associação Brasileira de Frigoríficos. Disponível em www.abrafigo.com.br. Acesso em novembro de 2010.

ALBERTON, D.; MITCHELL, D.A.; CORDOVA, J.; ZAMORA, P.P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. *Food Technol.* v.48, p.28-35, 2010.

APHA. Standard Methods for the Examination of water and wastewater, 21^a ed. Washington: Publication Office American Public Health Association, APHA, AWWA, WPCP, 2006.

BECK, M.B. Identification, estimation and control of biological waste water treatment processes. *IEEE Proceedings* 133. 1986.

BORNSCHEUER, U.T. Alteration of lipase properties by proteins engineering methods. *Oléagineux Corps Gras Lipides.* v.15, n.3, p. 184-188, 2008.

BORNSCHEUER, U.T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; KRISHNA, S.H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in biotechnol.* v.20, n.10, p. 433-437, 2002.

BRAHMI, M.; BELHADI, N.H.; HAMDY, H.; HASSEN, A. Modeling of secondary treated wastewater disinfection by UV irradiation: Effects of suspended solids content. *Journal of Environmental Sciences*, v.22, p.1218-1224, 2010.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais. São Paulo, CETESB. 1993.

CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

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

Catálogo das Indústrias 2010. Federação das Indústrias do Estado do Paraná, Rede Brasileira de Centros Internacionais de Negócios, 2010. 1 CD-ROM

CEMA 070 – CONSELHO ESTADUAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução nº 070 de 01 de outubro de 2009. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Paraná.

CHIABAI, R., REBOUÇAS, C.C., GONÇALVES, R.F. Remoção de óleos e graxas em dois sistemas de tratamento de esgoto sanitário associando reatores anaeróbios e aeróbios em série. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL*, 23, Campo Grande 18-23 set. ABES, 2005. 1CD-ROM.

COHEN, I.P.G.; CASTELLO, P.R.; FLECHA, F.L.G. Ice-induced partial unfolding and aggregation of an integral membrane protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1798, p.2040–2047, 2010.

CONAMA 357 – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Brasília – DF.

DAMASCENO, F.R.C.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Impact of the addition of an enzyme pool on an activated sludge system treating dairy wastewater under fat shock loads. *Chem Technol Biotechnol*, v.83, p.730–738, 2008.

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

DI BERNARDO, L; DANTAS, A. DI BERNARDO. Métodos e Técnicas de Tratamento de Água. 2ª ed. 2v. Rima, São Carlos, SP, 2005.

DIYOROV, J.K.; LUSTA, K.A.; TSIOMENKO, A.B.; KULAEV, I.S. Molecular forms of lipases and their localization in the fungus *Rhizopus microsporus* by immuno-electron microscopy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v.10, p.367-373, 1994.

DURLI, E. Tratamento de Efluentes de Indústria de Laticínios Utilizando Lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11. Tese de doutoramento. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química, Curitiba: 2007.

ECKENFELDER Jr, W. W. Industrial Water Pollution Control. 2ª ed., McGraw-Hill Inc., 1989.

EL-BESTWY, E., EL-MASRY, M. H., EL-ADL, N. I. Bioremediation of vegetable oil and grease from polluted wastewater using a sand biofilm system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 20, p. 551-557, 2004.

GEFOR, Grupo de estudo para la formación y docencia en enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Disponível em: www.gefor.4t.com/hongos/rhizopusmicrosporus.html acesso em: julho de 2010.

GRADY Jr., C. P. L.; DAIGGER, G. T.; LIM, H. C. Biological Wastewater Treatment. 2ª Ed., Marcel Dekker Inc., 1999.

Guia para Elaboração do Plano APPCC; carnes e derivados. (Série Qualidade e Segurança Alimentar). Projeto APPCC convênio CNI/SENAI/SEBRAE. SENAI – Departamento Nacional, Brasília, 1999.

HALLMICH, C.; GEHR, R. Effect of pre- and post-UV disinfection conditions on photoreactivation of fecal coliforms in wastewater effluents. *Water Research*, v.44, p.2885-2893, 2010.

HAMILTON, R.; BRAUN, B.; KOOPMAN, B.; SVORONOS, S. A. Estimation of nitrate reductase enzyme parameters in activated sludge using an extended Kalman filter algorithm. *Water Research* v.42, p.1889-1896, 2008.

HU, K.N.; TYCKO, R. What can solid state NMR contribute to our understanding of protein folding? *Biophysical Chemistry*. v.151, p10–21, 2010.

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia. Indicadores IBGE – Pesquisa Industrial Mensal de Produção Física no Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Brasília – DF, 2010.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 4. ed. Rio de Janeiro. ABES, 2005.

JÖRDENING, H.J.; WINTER, J. Environmental Biotechnology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005.

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

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

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; LIMA, V. M.; MITCHELL, D. A. Non-Aqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. *Food Technology and Biotechnology*, v. 42, p. 279-286, 2004.

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

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

LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.66, p.43-54, 2010.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J.M. Manual de Indústrias dos Alimentos. Livraria Varela, São Paulo, 1996.

MASSE, L., KENNEDY, K.J., CHOU, S.P. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *Journal of chemical Technology and Biotechnology*, v. 76, p. 629-635, 2001.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JÚNIOR, A. F. Aplicação de Lipases no Tratamento de Águas Residuárias com Elevados Teores de Lipídeos. *Química Nova*, v. 28, n. 2, 296-305, 2005.

MENDES, A. A.; FREITAS, L.; CASTRO, H. F.; *Resumos do VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática*, Rio de Janeiro, 2004.

METCALF & EDDY. Wastewater Engineering: treatment and reuse. Metcalf & Eddy Inc. 4^a ed. 2003.

NBR 10.004 – Classificação de Resíduos Sólidos. ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2004

PANDEY, A. Enzyme Technology. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.

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

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

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. Ciência, higiene e tecnologia da carne. 2^a ed., v.1. Editora da UFG, Goiânia, 2001.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H.F DE; FURIGO JÚNIOR, A. Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola utilizando lipase de *Candida rugosa*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, Florianópolis. UFSC, 2003. 1CD-ROM.

POLIZELI, M.L.T.M.; GUIMARÃES, L.H.S. ; NOGUEIRA, S.C.P. ; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIM, V.C.; ZANOELO, F.F.; AQUINO, A.C.M.M.; JUNIOR, A.B. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology* n.37, p.474-480, 2006.

RAMANIA, K.; KENNEDY, L.J.; RAMAKRISHNANA, M.; SEKARANA, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochemistry*, v.45, p.1683–1691, 2010.

RAMALHO, R.S. Introduction to Wastewater Treatment Process. 2ªed., Academic Press Inc., 1983.

RIGO, E.; RIGONI, R.E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M. Application of Different Lipases as Pretreatment in Anaerobic Treatment of Wastewater. *Environmental Engineering Science*. v.25, n.9, 2008.

ROSA, D.R.; DUARTE, I.C.S; SAAVEDRA, N.K.; VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. v.100, p.6170–6176, 2009.

SALUM, T.F.C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C.I.; CÔCCO, L.C.; MITCHELL, D.A; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry* v.45, p.1348–1354, 2010.

SANEPAR. Programa de Educação e Qualificação: Tratando o Esgoto – Ambiente Legal. v.4, Companhia de Saneamento do Paraná, 2005.

SANTOS, M. M.; da ROSA, A. S.; BOIT, S. D. D.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Thermal denaturation: Is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresource Technology*, v. 93, p. 261-268, 2004.

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, P.187-202, 1997.

STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. Review of Cellular Metabolism. *Metabolic Engineering*, p. 21-79, 1998.

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

SUN, S.Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. *Process Biochemistry*, v.43, p.219–224, 2008.

VALLADÃO, A. B. G.; BIAGGIO, J. A.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Avaliação da toxicidade de preparado enzimático sólido utilizado no tratamento anaeróbio de efluentes de abatedouro de aves. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIASANITÁRIA E AMBIENTAL*, 24, Belo Horizonte, 3-7 set. ABES, 2007. 1CD ROM.

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*. v. 74, n. 3, p. 231-239, 2000.

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

VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. v.1, 3ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2005.

VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. v.2, Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 1996.

VON SPERLING, M. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias. v.4, 2ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 2002.

WU, L.; GE, G.; WAN, J. Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. *Journal of Environmental Sciences*. v.21, p.237–242, 2009.

YANG, J.; MA, X.; ZHANG, Z.; CHEN, B.; LI, S.; Wang, G. Lipase immobilized by modification-coupled and adsorption–cross-linking methods: A comparative study. *Biotechnology Advances*, v.28, p.644–650, 2010.