



**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE EFLUENTES
COM ALTO TEOR DE LIPÍDEOS PREVIAMENTE TRATADOS
COM ENZIMAS HIDROLÍTICAS**

Adriano Aguiar Mendes

Lorena – SP - Brasil

2004

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE EFLUENTES
COM ALTO TEOR DE LIPÍDEOS PREVIAMENTE TRATADOS
COM ENZIMAS HIDROLÍTICAS**

Dissertação de Mestrado
apresentada como parte das exigências para
a obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

Banca examinadora:

Dr^a. Heizir Ferreira de Castro (Presidente)
Dr. Marcelo Zaiat
Dr. Pedro Carlos de Oliveira

Estudante:

Adriano Aguiar Mendes

Lorena – SP - Brasil

2004

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Universitária - FAENQUIL

Mendes, Adriano Aguiar
M522a Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de
efluentes com alto teor de lipídeos previamente tratados com enzimas
hidrolíticas. / Adriano Aguiar Mendes. Lorena, 2004.

137f.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Engenharia
Química de Lorena. Departamento de Engenharia Química.
Orientador: Heizir Ferreira de Castro

1. Hidrolases. 2. Lipase. 3. Lipídeos. 4. Águas Residuárias.
5. Hidrólise. 6. Biodigestão. I. Castro, Heizir Ferreira de, orient.
II. Título.

CDU: 577.152.3

RESUMO

Avaliação da Biodegradabilidade de Efluentes com Alto Teor de Lipídeos Previamente Tratados com Enzimas Hidrolíticas. Adriano Aguiar Mendes. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientadora: Dr^a. Heizir Ferreira de Castro (Departamento de Engenharia Química, FAENQUIL, CP 116, 12.600-970, Lorena, SP, Brasil). Banca examinadora: Dr. Marcelo Zaiat e Dr. Pedro Carlos de Oliveira. Julho 2004.

O objetivo deste trabalho foi viabilizar tecnicamente a aplicação de um tratamento enzimático para remoção de lipídeos presentes em efluentes gerados em indústrias de produtos lácteos. O método consistiu em utilizar enzimas hidrolíticas com elevada atividade lipolítica, promovendo a reação de hidrólise dos lipídeos e outros componentes orgânicos. O enfoque foi baseado no uso de preparações de lipases pancreáticas de baixo custo e disponíveis comercialmente no mercado brasileiro – preparações fornecidas pelas empresas Kin Master (LKM) e Nuclear (LNU). O trabalho experimental foi realizado em três etapas. Inicialmente, o efluente obtido na Cooperativa Maringá (Guaratinguetá-SP) foi caracterizado segundo normas técnicas recomendadas, quanto às concentrações de lipídeos, proteínas, demanda química de oxigênio (DQO), entre outras. Em seguida, as preparações de lipase (LKM e LNU) foram testadas na hidrólise de lipídeos contidos no efluente em reatores de bancada, por meio de um planejamento experimental, considerando como variáveis independentes o tipo de preparação enzimática (LKM e LNU) e a concentração de cloreto de sódio, em substituição à goma arábica e como variável dependente a concentração de ácidos graxos formados. De acordo com o modelo matemático proposto, a reação de hidrólise foi maximizada (17,97 mM) para efluentes suplementados com 7 mM de NaCl e preparação enzimática LNU 0,3% (m/m), mantendo fixas as condições de temperatura (37°C), tempo de hidrólise (6 h), ajuste de pH 8,0 com solução alcalinizante NaOH 1M e agitação magnética (200 rpm). A hidrólise do efluente empregando a lipase LNU foi otimizada por meio de um segundo planejamento fatorial e de acordo com os resultados obtidos foi possível estabelecer as condições (concentração enzimática 0,5% (m/m), ajuste de pH 8,0 com solução alcalinizante NaOH 1M e concentração de íons cálcio de 10 mM, sob agitação magnética de 200 rpm, temperatura de 37°C e por um período de 24 h) favorecendo a maior formação de ácidos (54,36 mM). Na terceira etapa, foram efetuados testes para avaliar o impacto do tratamento enzimático proposto por meio de testes de biodegradabilidade dos efluentes bruto e hidrolisado, revelando um aumento na velocidade inicial de produção de metano de 46 mL/dia (efluente bruto) para 166 mL/dia, (efluente hidrolisado). Foram também realizados testes de biodegradabilidade anaeróbia de efluentes contendo diferentes concentrações de ácidos graxos livres (tempo de hidrólise entre 4 - 24 h). A variação no tempo de hidrólise influenciou positivamente na redução de proteínas e lipídeos presentes no efluente. O pré-tratamento enzimático foi otimizado para um tempo de 12 h, aumentando em duas vezes a formação de metano (445 ± 29 mL) e a remoção de matéria orgânica (DQO) em relação ao controle. Essa elevada porcentagem de remoção de matéria orgânica, acima de 69,1%, foi provavelmente decorrente da assimilação dos componentes oriundos da hidrólise de lipídeos pelos microrganismos anaeróbios. Todas as amostras pré-tratadas enzimaticamente apresentaram velocidades iniciais superiores às obtidas nas amostras de efluente bruto, com eficiência de formação de metano de aproximadamente 2-3 vezes

superior. A elevada concentração de ácidos graxos formados na etapa de hidrólise enzimática não promoveu inibição na biodegradação pelos microrganismos anaeróbios, devido à elevada velocidade de degradação obtida nos primeiros dias. Além disso, foi testada a possibilidade de efetuar simultaneamente as etapas de hidrólise e biodigestão, revelando resultados promissores com relação à formação de biogás (354 ± 34 mL). O custo de aplicação da lipase selecionada foi da ordem de US\$ 0,33 por litro de efluente tratado, possibilitando desta forma, condições mais adequadas para o descarte do efluente, em termos de demanda química de oxigênio (DQO) e turbidez.

ABSTRACT

The main objective of this work was to turn feasible the application of an enzymatic treatment to degrade lipids present in wastewater generated by dairy industries. The procedure consisted of using hydrolytic enzymes with high lipolytic activity to promote hydrolysis reaction of lipids and other organic components. The focus was based on the use of low cost lipase preparations commercially available in Brazil - Kin Master (LKM) and Nuclear (LNU). The experimental work was performed in three steps. Initially, the wastewater obtained from Maringa Corporation (Guaratingueta-SP) was characterized according to the standard techniques with regard to the lipid and protein levels, Chemical Oxygen Demand (COD), among others. Next, the wastewater was submitted to enzymatic hydrolysis using the lipase preparations (LKM and LNU), aiming to select the most suitable enzyme preparation considering both cost and efficiency. For this purpose a factorial design was used, considering the type of enzymatic preparation (LKM and LNU) and the concentration of emulsifier agent (sodium chloride) as independent variable and the formation of free fatty acids as response variable. In agreement with the mathematical model, the hydrolysis reaction was maximized (17.97 mM) for wastewater supplemented with 7 mM of NaCl and 0.3% of the enzyme preparation LNU at the following operating conditions: temperature (37°C), hydrolysis time (6 h), adjustment of pH to 8.0 with NaOH 1M solution and magnetic agitation (200 rpm). The hydrolysis of the wastewater using the LNU lipase was further optimized by means of a second experimental design and the highest free fatty acids concentration (54.36 mM) was attained at the following conditions: enzyme concentration (0.5% w/w), adjustment of pH 8.0 with 1M NaOH solution, addition of ions calcium (10 mM), magnetic agitation (200 rpm), temperature (37°C) and for 24 h. The efficiency of the enzymatic pre-treatment under the conditions previously established was verified by running comparative biodegradability tests (crude and treated effluents) and for the treated effluent the formation of biogas (methane) was found to increase two times. The influence of the free fatty acids levels as a function of the hydrolysis time (4 to 24 h) on the effluent biodegradability showed a positive effect on the removal of lipids and proteins as well as the formation of biogas. The pretreatment was optimized for a hydrolysis time of 12 h, enabling high formation of methane (445 ± 29 mL) and 78.2% of organic matter removal (COD). This high percentage of organic matter removal was probably due to the assimilation of the components obtained from the lipid hydrolysis by the anaerobic microorganisms. All samples pretreated with enzyme showed higher reaction rate in relation to crude effluent, resulting in an increase in methane formation of 2-3 times. Due to the high degradation rate obtained in the first days, the high levels of free fatty acids formed by the enzymatic hydrolysis did not inhibit the performance of the anaerobic microorganisms. Promising results in relation to the biogas formation (354 ± 34 mL) were also found when hydrolysis and biodegradation steps were carried out simultaneously. The cost application of the selected lipase was in the order of US\$ 0.33 for liter of wastewater treated. In addition the enzymatic treatment considerably improved the anaerobic reactors operational conditions and the effluent quality (lower content of suspended solids and less turbidity). Thus, the use of enzymatic was seemed to be a very promising alternative for treating wastewaters having high fat contents, such as those from the dairy industry.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maura e Vitor e aos meus irmãos Aldo, André e Jaqueline pela compreensão, estímulo, paciência, amor, finanças e colaboração em todos os sentidos, em especial ao meu irmão André Aguiar pela força, amizade e companheirismo.

A minha orientadora Profa. Heizir Ferreira de Castro pela excelente e competente orientação, paciência, amizade e aos ensinamentos para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do DEQUI pelos ensinamentos adquiridos e amizade, em especial à minha amiga Profa. Maria da Rosa Capri.

Ao Sr. Brandão e a mestrandia Ivy da ETE no auxílio às análises de DQO.

Ao Sr. José Luiz da SAEEG pela dedicação na obtenção do efluente e do lodo anaeróbio

Ao Prof. Ismael Maciel de Mancilha pela obtenção do soro de queijo e sugestões valiosas.

Ao amigo Dr. Ernandes B. Pereira pela amizade sincera e ajuda nos testes de Biodegradabilidade e a amiga Cleide Mara (Presença) pela simpatia e amizade.

Aos alunos e amigos do Laboratório de Biocatálise, Daniele, Michele, Ariela, Grazielle, Luciana, Bruno, Larissa, Tânia, Roberta Lee e Fabrício, em especial à minha amiga Michele pela amizade sincera, alegria e companheirismo nas horas difíceis e baladas.

Aos amigos de Pedralva (Chico, Raquel, Sheila, Paula, Fernanda, Lílian, Andréia, Érika, Bebeto e Carlos) e a Sylvia, Flávia, Carla, Dani Prezzotto, Andréia, Patrícia, Amanda, Manu e a Rep. 486 - Fernanda, Iana, Michele e Marina pela ótima convivência e amizade.

Ao Tom and Jerry pela ajuda oferecida no Carnaval.

Ao CNPq-CT Hidro pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Tratamento de Resíduos.....	3
2.2. Lipídeos	7
2.3. Problemas Relacionados aos Elevados Teores de Lipídeos no Tratamento Anaeróbico de Águas Residuárias.....	9
2.4. Utilização de Enzimas em Tratamento de Efluentes	16
2.5. Lipases	21
2.5.1. Fontes e Propriedades	22
2.5.2. Reações Catalisadas pelas Lipases	23
2.5.3. Mecanismo de Atuação.....	26
2.5.4. Especificidade.....	27
2.5.5. Fatores que Interferem no Processo de Hidrólise de Lipídeos	29
2.5.5.1. Concentração de Substrato.....	29
2.5.5.2. Efeito do pH.....	30
2.5.5.3. Temperatura	30
2.5.5.4. Agentes Emulsificantes.....	31
2.5.5.5. Efeito dos Íons	32
2.5.6. Aplicação de Lipases em Tratamento de Efluentes Ricos em Lipídeos	33
2.6. Efluentes da Indústria de Produtos Lácteos.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Materiais	41
3.1.1. Enzimas.....	41
3.1.2. Efluentes	41
3.1.3. Lodo Anaeróbico	41
3.2. Caracterização das Propriedades Cinéticas e Bioquímicas das Preparações de Lipases	41
3.2.1. Determinação da Concentração de Proteína	41
3.2.2. Determinação da Atividade Lipolítica.....	42
3.2.3. Influência do pH	42
3.2.4. Influência da Temperatura	43
3.2.5. Estabilidade Térmica	43
3.2.6. Influência de Íons Metálicos.....	43
3.2.7. Influência da Concentração Inicial de Substrato	44
3.3. Caracterização do Efluente e do Soro de Queijo	44
3.3.1. Determinação da Concentração de Lipídeos	44
3.3.2. Teor de Sólidos Totais	45
3.3.3. Índice de Acidez	45
3.3.4. Índice de Saponificação	45
3.3.5. Porcentagem de Ácidos Graxos Livres.....	46
3.3.6. Demanda Química de Oxigênio (DQO)	46
3.3.7. Determinação de Cor	47
3.3.8. Determinação de Cor por Varredura.....	48

3.3.9. Concentração de Glicerol.....	48
3.3.10. Concentração de Proteínas.....	49
3.3.11. Concentração de Açúcares Redutores.....	49
3.4. Testes de Hidrólise Enzimática.....	49
3.4.1 Seleção da Preparação Enzimática para Hidrólise do Soro de Queijo	49
3.4.2. Seleção da Preparação Enzimática para Hidrólise do Efluente	50
3.4.3. Hidrólise do Efluente com a Lipase LNU	51
3.5. Hidrólise em Reatores de Bancada	51
3.6. Testes de Atividade Metanogênica e Biodegradabilidade Anaeróbia	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. Propriedades Catalíticas das Preparações de Lipase.....	54
4.1.1. Influência do pH e Temperatura na Atividade das Preparações de Lipases	54
4.1.2. Estabilidade Térmica das Preparações Enzimáticas	55
4.1.4. Influência de Íons Metálicos na Atividade Hidrolítica das Lipases	57
4.1.5. Determinação dos Parâmetros Cinéticos	59
4.2. Caracterização do Efluente e Soro de Queijo	60
4.2.1. Composição de Ácidos Graxos do Soro de Queijo e Efluente	62
4.3. Testes de Hidrólise do Soro de Queijo com as Preparações Enzimáticas LPP e LKM.....	63
4.4. Testes de Hidrólise do Efluente	71
4.4.1 Testes Preliminares de Seleção da Preparação de Lipase.....	71
4.4.2 Otimização por Planejamento Fatorial	73
4.5. Hidrólise de Lipídeos com a Preparação Enzimática LNU	77
4.6. Testes de Atividade Metanogênica	81
4.6.1. Efeito do Tempo de Hidrólise Enzimática na Biodegradabilidade Anaeróbia	85
5. CONCLUSÕES.....	97
6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
8. APÊNDICES	112
Apêndice 8.1	112
Apêndice 8.2	115
Apêndice 8.3	117
Apêndice 8.4	125
Apêndice 8.5	132
Apêndice 8.6	134

ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 2.1.	Níveis de tratamento de águas residuárias	3
Tabela 2.2.	Valores de DBO para diferentes tipos de águas residuárias	5
Tabela 2.3.	Sistemas biológicos tradicionais e funções específicas	6
Tabela 2.4.	Fontes de lipídeos e suas concentrações em águas residuárias	7
Tabela 2.5.	Influência dos lipídeos na digestão anaeróbia, medida pela concentração de ATP e pela atividade metanogênica.....	11
Tabela 2.6.	Concentração máxima de produtos formados durante a degradação anaeróbia do ácido linoleico	13
Tabela 2.7.	Enzimas com potenciais aplicações em tratamento de efluentes	19
Tabela 2.8.	Especificidade das lipases e suas aplicações.....	28
Tabela 2.9.	Características dos efluentes da indústria de derivados lácteos.....	38
Tabela 2.10.	Caracterização de efluentes de laticínios de acordo com os produtos beneficiados	39
Tabela 3.1.	Testes de hidrólise do soro de queijo empregando as preparações enzimáticas.....	50
Tabela 3.2.	Níveis das variáveis utilizados nos ensaios de hidrólise do efluente	51
Tabela 4.1.	Propriedades catalíticas das preparações de lipases testadas	54
Tabela 4.2.	Constante de inativação térmica e tempo de meia-vida das preparações LPP, LKM e LNU (tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0), após 1 h de incubação	56
Tabela 4.3.	Parâmetros cinéticos para as preparações de lipases LPP, LKM e LNU	60
Tabela 4.4.	Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas das preparações das lipases (LPP, LKM e LNU).....	60
Tabela 4.5.	Caracterização do efluente e do soro de queijo.....	61
Tabela 4.6.	Composição de ácidos graxos contidos na gordura do leite, soro de queijo e efluente.....	62
Tabela 4.7.	Composição do soro de queijo tratado enzimaticamente.....	70

Tabela 4.8.	Composição do efluente tratado enzimaticamente, empregando as lipases LKM e LNU.....	72
Tabela 4.9.	Matriz do planejamento experimental na hidrólise de lipídeos contidos no efluente por um período de 6 h.....	74
Tabela 4.10.	Efeitos calculados, estimativa de erro e valores do teste t de Student's para os ácidos graxos formados na hidrólise de lipídeos do efluente	76
Tabela 4.11.	Análise de Variância do planejamento fatorial completo 2 ² proposto	76
Tabela 4.12.	Composição do efluente tratado enzimaticamente, empregando a lipase LNU (6h)	77
Tabela 4.13.	Cotação das preparações de lipase LPP, LKM e LNU	77
Tabela 4.14.	Hidrólise de lipídeos das águas residuárias empregando a lipase LNU	78
Tabela 4.15.	Composição do efluente tratado enzimaticamente, empregando a lipase LNU.....	81
Tabela 4.16.	Influência de tempo de hidrólise nas características do efluente	85
Tabela 4.17.	Biodegradabilidade anaeróbia de efluentes pré-tratados enzimaticamente	86

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura 2.1.	Reações envolvidas na transformação de lipídeos em lodo ativado. ..	9
Figura 2.2.	Etapas de degradação anaeróbia dos componentes orgânicos presentes nos efluentes.....	10
Figura 2.3.	Ilustração da colmatação e flotação de lipídeos em reatores UASB após 12 dias de operação.	14
Figura 2.4.	Reações catalisadas pelas lipases.	24
Figura 2.5.	Hidrólise seqüencial dos grupos acila no glicerídeo catalisada por lipases.....	29
Figura 4.1.	Influência do pH sobre a atividade hidrolítica das preparações de lipases LPP, LKM e LNU.....	55
Figura 4.2.	Influência da temperatura na atividade hidrolítica das preparações de lipase LPP, LKM e LNU.	55
Figura 4.3.	Influência da temperatura de incubação sobre a atividade residual das preparações de LPP, LKM e LNU. Ensaio realizado a 37°C, substrato azeite de oliva 50% (1 h).....	56
Figura 4.4.	Influência dos íons metálicos sobre a atividade hidrolítica das preparações de lipases LPP, LKM e LNU, na concentração de 20 mM.....	57
Figura 4.5.	Atividade hidrolítica das lipases LPP, LKM e LNU em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo/água (37 °C).	59
Figura 4.6.	Hidrólise do teor de lipídeos do soro de queijo, empregando a preparação de lipase pancreatina (LKM), mantendo fixas a concentração enzimática (3mg/mL), temperatura (40°C), agitação mecânica (200 rpm) e tempo (24 h).....	66
Figura 4.7.	Hidrólise do teor de lipídeos do soro de queijo, empregando a preparação de lipase pancreática (LPP), mantendo fixas a concentração enzimática (3mg/mL), temperatura (40°C), agitação mecânica (200 rpm) e tempo (24 h).....	67
Figura 4.8.	Concentração de ácidos graxos formados pela hidrólise do soro de queijo empregando a lipase LKM.....	70
Figura 4.9.	Concentração de ácidos graxos formados pela hidrólise do soro de queijo empregando a lipase LPP.....	70

Figura 4.10.	Hidrólise de lipídeos do efluente por LKM na presença de 3% m/m de goma arábica, 0,3% de lipase, ajuste de pH=8,0 com NaOH 1M a 40°C e 200 rpm.	72
Figura 4.11.	Hidrólise de lipídeos do efluente por LNU na presença de 3% m/m de goma arábica, 0,3% de lipase, ajuste de pH=8,0 com NaOH 1M a 40°C e 200 rpm.	72
Figura 4.12.	Perfil de hidrólise dos lipídeos do efluente, empregando a lipase pancreatina (LNU), temperatura (37°C), agitação mecânica (200 rpm) em função do tempo.	79
Figura 4.13.	Concentração de ácidos graxos formados pela hidrólise de lipídeos, anterior aos testes de biodegradabilidade empregando a lipase LNU.	80
Figura 4.14.	Cinética de biodegradação do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente com a preparação de lipase LNU (35°C, 28 dias, agitação 200 rpm).	82
Figura 4.15.	Esquema representativo dos testes de biodegradabilidade anaeróbia (temperatura 35°C, agitação de 200 rpm).	83
Figura 4.16.	Perfil cinético dos testes de biodegradabilidade do efluente bruto e efluente pré-tratado enzimaticamente com a lipase LNU (35°C, 28 dias, agitação 200 rpm).	84
Figura 4.17.	Cinética de biodegradação do efluente tratado com LNU, variando o tempo de hidrólise de 4, 8, 12 e 24 h e os controles suplementado com enzima, ajuste de pH e íons cálcio e o efluente bruto.	87
Figura 4.18.	Perfil cinético dos testes de biodegradabilidade do efluente bruto e efluente pré-tratado enzimaticamente com a lipase LNU (35°C, 15 dias, agitação 200 rpm).	88
Figura 4.19.	Determinação de cor do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente por varredura nas regiões do ultra violeta e do visível após 15 dias de biodegradabilidade anaeróbia.	93
Figura 4.20.	Amostras do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente por um período de 12 h após a etapa de biodigestão.	94

NOMENCLATURA

AG:	Ácidos Graxos
AGCL:	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGL:	Ácidos Graxos Livres
AGV:	Ácidos Graxos Voláteis
AOT:	bis (2-etilexilssulfosuccinato de sódio)
ATP:	Trifosfato de Adenosina
C ₁ :	Controle 1 (efluente bruto)
C ₂ :	Controle 2 (etapas de hidrólise e biodigestão simultâneas)
EPA:	Ácido Eicosapentaenóico
DBO:	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DG:	Diglicerídeos
DHA:	Ácido Docosaexaenóico
DBO:	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO:	Demanda Química de Oxigênio
EGSB:	Expanded Granular Sludge Bed
EDTA:	Etileno Diamino Acetato Dissódico
FAD:	Flavina Adenina Dinucleotídeo
LKM:	Lipase Kin Master
LNU:	Lipase Nuclear
LPP:	Lipase Sigma
K _d :	Constante de Desativação Térmica
K _m :	Constante de Michaelis-Menten
MG:	Monoglicerídeos
NAD:	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NKT:	Nitrogênio Kjeldahl Total
OG:	Óleos e Gorduras
pNPP:	p-nitrofenilpalmitato
PUFA:	Polyunsaturated Fatty Acids
SST:	Sólidos Solúveis Totais
SSV:	Sólidos Solúveis Voláteis
V _{max} :	Velocidade Máxima
TG:	Triglicerídeos
UASB:	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

1. INTRODUÇÃO

Os laticínios representam um importante setor da indústria alimentícia, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Entretanto, considerando o grande número de empresas que lançam seus efluentes sem nenhum tipo de tratamento nos cursos d'água, a contribuição dessas indústrias, em termos de poluição hídrica, principalmente com relação à carga orgânica, é bastante significativa. O problema agrava-se se for considerado que 90% dos laticínios, em funcionamento, são de pequeno e médio portes, não possuindo quadro qualificado para lidar com as mudanças necessárias à implementação de tecnologias limpas e com a operação de sistemas de tratamento de efluentes (MACHADO *et al.*, 1999).

O efluente gerado, pelos laticínios, no beneficiamento do leite, contém uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) em torno de 3000 mg/L. Em setores, onde há uma grande produção de queijos e derivados, o valor de DQO é superior a 50000 mg/L (GAVALA *et al.*, 1999). Desse montante, o teor de lipídeos é superior a 100 mg/L (HWU *et al.*, 1998). Os lipídeos causam flotação da biomassa e má formação de grânulos de lodo em reatores anaeróbios do tipo UASB (HWU *et al.*, 1998; GAVALA *et al.*, 1999), toxicidade a microrganismos acetogênicos e metanogênicos (HANAKI *et al.*, 1981), formação de espumas devido ao acúmulo de ácidos graxos não biodegradados (SALMINEN e RINTALA, 2002) e decréscimo da concentração de trifosfato de adenosina (ATP) (HANAKI *et al.*, 1981; PERLE *et al.*, 1995).

Desta forma, a digestão anaeróbia destes rejeitos é um processo lento, tendo como etapa limitante à liberação de ácidos graxos pelos microrganismos específicos com atividade lipolítica (PERLE *et al.*, 1995). A biodegradação de lipídeos, em compostos mais simples, consiste em utilizar lipases para promover a reação de hidrólise por via sequencial dos grupos acila no glicerídeo (HARALDSSON, 1991).

Lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas, presentes em acilgliceróis (CASTRO *et al.*, 2004). As lipases podem ser classificadas como régio-específicas e não específicas, ambas de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de lipídeos (CASTRO *et al.*, 2004). As lipases específicas hidrolisam ácidos graxos específicos, como é o caso das lipases de fonte animal que hidrolisam ácidos graxos na posição 1,3 (BENZONANA e

DESNUELLE, 1965). Esse tipo de tratamento apresenta algumas vantagens, tais como a especificidade que permite controlar os produtos, o que leva a um aumento dos rendimentos pela não-geração de subprodutos tóxicos, condições moderadas de operação, redução do custo em termos de energia e de equipamentos, tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental (MASSE *et al.*, 2001).

A utilização de lipases pancreáticas é mais adequada ao pré-tratamento de efluentes das indústrias de derivados lácteos, ricos em gorduras animais, pois essas lipases são mais eficientes na hidrólise de triacilgliceróis contendo ácidos graxos com mais de 12 carbonos, ao contrário de lipases microbianas, como por exemplo de *Rhizomucor miehei*, que possui maior especificidade por triacilgliceróis contendo ácidos graxos com menos de 12 carbonos (MASSE *et al.*, 2001). Aproximadamente 97% dos ácidos graxos contidos no efluente, em estudo, é constituído por ácidos graxos com mais de 12 carbonos.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a biodegradabilidade anaeróbia de efluentes de indústrias de produtos lácteos previamente tratados com enzimas hidrolíticas. O enfoque foi baseado no uso de preparações de lipases de baixo custo disponíveis comercialmente. Levando em consideração estes aspectos, o objetivo geral do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas:

⇒ Caracterização do efluente em termos de demanda química de oxigênio, sólidos totais e voláteis, teor de lipídeos, proteínas para a seleção de preparações comerciais de lipases capazes de reduzir com eficiência a carga lipolítica do efluente;

⇒ Determinação das condições de hidrólise enzimática dos lipídeos presentes no efluente quanto aos principais parâmetros (concentração de enzima, concentração de agente emulsificante, concentrações de íons cálcio e cloreto de sódio, pH, e tempo de incubação) visando a elaboração de um modelo matemático que permita predizer as condições adequadas para se alcançar diferentes graus de hidrólise dos lipídeos.

⇒ Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de efluentes pré-tratados com lipases contendo diferentes concentrações de ácidos graxos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tratamento de Resíduos

O volume e a concentração dos despejos de uma determinada indústria variam dentro de amplos limites, dependendo dos processos de fabricação empregados e dos métodos de controle dos despejos. Com isto, a caracterização de efluentes é uma tarefa básica para o equacionamento adequado do problema de tratamento. É nessa etapa que são obtidas informações quanto à composição e vazão da água residuária, levando em conta as suas variações ao longo do tempo em função das atividades responsáveis por sua geração. Com base nessas informações, podem ser adotados métodos físicos, químicos ou biológicos no tratamento de efluentes (GLAZER e NIKAIDO, 1995). Os métodos físicos e químicos são classificados em níveis preliminares e primários de tratamento e os biológicos em níveis secundários, como é mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Níveis de tratamento de águas residuárias

Níveis	Remoção
Preliminar	Sólidos em suspensão grosseiros (materiais de maiores dimensões e areia)
Primário	Sólidos em suspensão sedimentáveis, DBO em suspensão (matéria orgânica componente dos sólidos em suspensão sedimentáveis)
Secundário	DBO em suspensão (matéria orgânica em suspensão fina, não removida no tratamento primário), DBO solúvel (matéria orgânica na forma de sólidos dissolvidos)
Terciário	Nutrientes, patogênicos, compostos não biodegradáveis, metais pesados, sólidos inorgânicos dissolvidos e sólidos em suspensão remanescentes

Fonte: VON SPERLING, 1998.

Os métodos físicos de tratamento abrangem a remoção de sólidos de dimensões relativamente grandes em suspensão, areias e lipídeos. Para essa finalidade são utilizadas grades, peneiras simples ou rotativas, caixas de areia ou tanques de remoção de óleos e graxas, decantadores e filtros de areia. As grades destinam-se a reter sólidos grosseiros em suspensão e são utilizadas para a proteção de bombas, válvulas e outros equipamentos. Peneiras são dispositivos destinados a retenção de partículas mais finas. As caixas de areia destinam-se a retenção de detritos pesados inertes, em suspensão nas

águas residuárias e são usadas para proteger bombas e tubulações contra abrasão e entupimento. Os tanques de decantação são empregados na separação de sólidos sedimentáveis contidos em águas residuárias (VAZOLLER *et al.*, 1989).

Na remoção de lipídeos em estado livre, geralmente são utilizadas caixas de gordura comuns que permitem a sua separação por retirada manual ou por meio de raspadores na superfície. Para melhor desempenho dessas caixas, deve ser evitado pH acima de 8,5 na alimentação da caixa, pois ocorre a saponificação ou emulsificação e excesso de detergentes prejudica a eficiência de separação pela formação de gotículas de menor tamanho, com menor velocidade ascensional (MARSHALL e HARPER, 1984). No caso de formação de emulsão, esta deve ser quebrada pela adição de produtos químicos seguida de flotação com ar dissolvido. Apesar da remoção melhorar significativamente, a flotação apresenta custos operacionais elevados, além de gerar lodo químico, que deve ter uma destinação adequada (MARSHALL e HARPER, 1984).

Os métodos químicos podem ser utilizados para remover material coloidal, cor e turbidez, odor, ácidos, álcalis, metais pesados e óleos. A neutralização de despejos industriais pode ser necessária, não só para se evitar o lançamento de águas ácidas ou alcalinas no corpo de água receptor, mas também, como medida necessária para proteção.

Os processos físico-químicos permitem uma remoção parcial de sólidos totais, com o emprego de compostos como sulfato de alumínio, cloreto férrico e sulfito ferroso (RUSTON, 1993). Entretanto, os reagentes químicos empregados são de custos elevados e a remoção de sólidos dissolvidos é bastante reduzida. A remoção de sólidos dissolvidos é realizada por processos biológicos (VIDAL *et al.*, 2000).

Os processos biológicos dividem-se em aeróbios e anaeróbios (BRANCO e HESS, 1975). Os sistemas biológicos de tratamento de resíduos devem atender alguns importantes aspectos: (1) - remoção da matéria orgânica, portanto redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) do resíduo; (2) - se possível, degradação de compostos químicos orgânicos de difícil degradação (recalcitrantes); (3) - fornecimento de um efluente em condições que não afete o equilíbrio do sistema receptor final (rios, lagos, etc.). A Tabela 2.2 fornece alguns exemplos de águas residuárias potencialmente tratáveis por processos biológicos, bem como os valores de DBO desses rejeitos.

Tabela 2.2. Valores de DBO para diferentes tipos de águas residuárias

Águas residuárias	DBO (mg/L)
Esgotos sanitários	200-600
Efluentes de alimentos industrializados	500-2.000
Efluentes de cervejarias	500-2.000
Efluentes do processamento de óleo comestível	15.000-20.000
Efluentes de destilaria de álcool (vinhaça)	15.000- 20.000
Percolado de aterros sanitários (chorume)	15.000- 20.000
Efluentes de laticínios (sem recuperação de soro de queijo)	30.000
Efluentes de matadouros (sem recuperação de resíduos)	30.000

Fonte: GLAZER e NIKAIDO (1995).

Nos processos aeróbios a estabilização dos despejos é realizada por microrganismos aeróbios e facultativos; nos processos anaeróbios os microrganismos atuantes são os facultativos e anaeróbios. Os reatores aeróbios podem ser: lodos ativados, filtro biológico e lagoa de estabilização aeróbia. Nos processos anaeróbios de tratamento de despejos, a decomposição da matéria orgânica é conseguida na ausência de oxigênio molecular. Esta degradação refere-se às reações que reduzem as dimensões de partículas, tornando-as solúveis ou, em nível molecular, quebram cadeias ou ligações triplas ou duplas existentes. Os produtos finais do processo são metano e compostos inorgânicos, incluindo o dióxido de carbono, ácido sulfídrico e amônia (MACCARTY, 1982). A Tabela 2.3 mostra os sistemas biológicos tradicionais normalmente adotados com a finalidade de estabilização da matéria poluente. O sucesso da aplicação de cada um deles está relacionado com o conhecimento prévio do efluente a ser tratado, e da eficiente operação dos reatores na manutenção da atividade microbiana e das reações de mineralização desejadas.

Os principais microrganismos empregados no processo anaeróbio são as bactérias e arqueas. A capacidade de uma bactéria anaeróbia decompor um determinado substrato é bastante específica, dependendo das enzimas que possui. As enzimas, responsáveis pelas reações do processo de decomposição, apresentam alto grau de especificidade. A eficiência global de conversão da matéria orgânica em produtos estabilizados depende da eficiência de cada reação e do equilíbrio entre as espécies e entre os grupos de bactérias presentes no sistema anaeróbio (LEMA *et al.*, 1991).

Tabela 2.3. *Sistemas biológicos tradicionais e funções específicas*

Sistemas biológicos	Funções
Lagoas de estabilização	Fornecimento natural de oxigênio pelo desenvolvimento de algas em lagoas para a degradação microbiana de compostos orgânicos poluentes, e conversão a dióxido de carbono e água.
Lodos ativados, filtros biológicos, lagoas aeradas e valas de oxidação.	Degradação microbiana de compostos orgânicos poluentes por meio do metabolismo aeróbio facilitada pela disponibilidade artificial de oxigênio em reatores ou em lagoas, e conversão a dióxido de carbono e água.
Sistemas de nitrificação	Conversão de compostos orgânicos nitrogenados e amônia a nitratos
Sistemas de desnitrificação	Conversão de nitratos a nitrogênio gasoso
Sistema alternado anóxico e aeróbio	Remoção de nutrientes, particularmente de fosfatos.
Biodigestão anaeróbia	Degradação microbiana de compostos orgânicos a ácidos orgânicos, álcoois, hidrogênio, dióxido de carbono e metano.

Fonte: COOKSON JR. (1995).

Contrário aos processos aeróbios, os processos anaeróbios não necessitam de equipamentos de aeração artificial e há geração de biogás (CH₄) que pode ser aproveitado na indústria como fonte de energia. O processo anaeróbio possui baixa produção de biomassa, apenas 10 a 20% do volume produzido no aeróbio, devido à reduzida taxa de crescimento dos microrganismos no consórcio anaeróbio (WENDT *et al.*, 1999). Dentre os diversos tipos de reatores anaeróbios utilizados, o reator de leito de lodo anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) é o mais utilizado industrialmente no Brasil (KOETZ *et al.*, 1996). A vantagem desse reator é a habilidade de reter alta concentração de biomassa com alta produção de biogás.

O reator UASB consiste, basicamente, em um tanque em cuja parte inferior está localizada a zona de digestão e na parte superior a zona de decantação e separação do gás (SOUZA, 1986). O efluente a ser tratado é uniformemente distribuído na base do reator e passa por meio da camada de lodo biológico, a qual transforma a matéria orgânica presente no efluente, principalmente em metano e gás carbônico.

Nos reatores de leito de lodo anaeróbio de fluxo ascendente, é importante a agregação de bactérias. A formação de agregados pode ser realizada por floculação microbiana e/ou granulação (NOVAES, 1986).

2.2. Lipídeos

A fração de lipídeos é caracterizada por óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres e juntamente com proteínas e carboidratos, compõem os principais compostos orgânicos de águas residuárias de diversas indústrias de alimentos (RAUNKJAER *et al.*, 1994; HENZE, 1992).

Lipídeos são importantes compostos, presentes em águas residuárias, que causam grandes danos ao meio ambiente, como a formação de filmes de óleo nas superfícies aquáticas, impedindo a difusão de oxigênio do ar para esse meio e o mais importante, promove a mortandade da vida aquática (MONGKOLTHANARUK e DHARMISTHITI, 2002).

Os lipídeos se encontram, preferencialmente, na forma de triacilgliceróis e uma pequena parte como ácidos graxos livres de cadeia longa (AGCL) (QUÉMÉNUER e MARTY, 1994). A presença de triacilgliceróis e AGCL é bastante similar, constituindo, aproximadamente, em 80% de ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico (QUÉMÉNUER e MARTY, 1994). Dentre esses, o ácido graxo mais abundante é o ácido oleico (C_{18:1}) (KOMATSU *et al.*, 1991; QUÉMÉNUER e MARTY, 1994).

As principais fontes de geração de lipídeos são indústrias de óleos comestíveis, curtumes, matadouros, sorvetes, laticínios e os efluentes domésticos e de restaurantes, principalmente de fast food (HWU *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2001). Os valores de concentração de lipídeos, nesses efluentes, são mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Fontes de lipídeos e suas concentrações em águas residuárias

Tipos de Efluentes	Concentração de Lipídeos (mg/L)	Referências
Matadouros e avícolas	Acima de 500	MASSE <i>et al.</i> , 2003
Laticínios	4680	MENDES <i>et al.</i> , 2004
Restaurantes	98	DHARMISTHITI e KUHASUNTISOOK, 1998
Óleos comestíveis	16000	DE FELICE <i>et al.</i> , 1997
Sorvetes	845	HAWKES <i>et al.</i> , 1995
Doméstico	40-100	FORSTER, 1992

Nas estações de tratamento desses efluentes, a alta concentração de triacilgliceróis, necessita inicialmente ser hidrolisada, para em seguida ser transformada em fonte de carbono para as bactérias e posteriormente ser convertido em biomassa (lodo aeróbio) (DUEHOLM *et al.*, 2001).

A transformação de lipídeos em lodo aeróbio é necessária por duas razões:

- os lipídeos contribuem com 30-40% da matéria orgânica, presentes nos efluentes;
- esses compostos estimulam o crescimento de microrganismos filamentosos e na remoção de nutrientes como fósforo e nitrogênio, promovendo a sustentação do lodo formado (DUEHOLM *et al.*, 2001). Com baixa concentração desses microrganismos, a probabilidade de formação de grânulos maiores de lodo é reduzida, acarretando sua flotação (LIU *et al.*, 2003).

A transformação de lipídeos em lodo aeróbio empregando a espécie microbiana *Microthrix parvicella* foi estudada por DUEHOLM *et al.* (2001), por meio do monitoramento das taxas máximas de consumo de oxigênio e nitrogênio. Esses autores observaram que os AGCL e triacilgliceróis adsorvidos, pelo lodo, dificultam a quantificação de oxigênio e nitrogênio consumidos para produção de células. Além disso, observaram que a hidrólise, dos triacilgliceróis em AGCL, é uma etapa lenta e não adequada para caracterizar as taxas de oxigênio e nitrogênio consumidos. O modelo conceitual das etapas de transformação de lipídeos em lodo aeróbio, proposto por DUEHOLM *et al.* (2001) é mostrado na Figura 2.1.

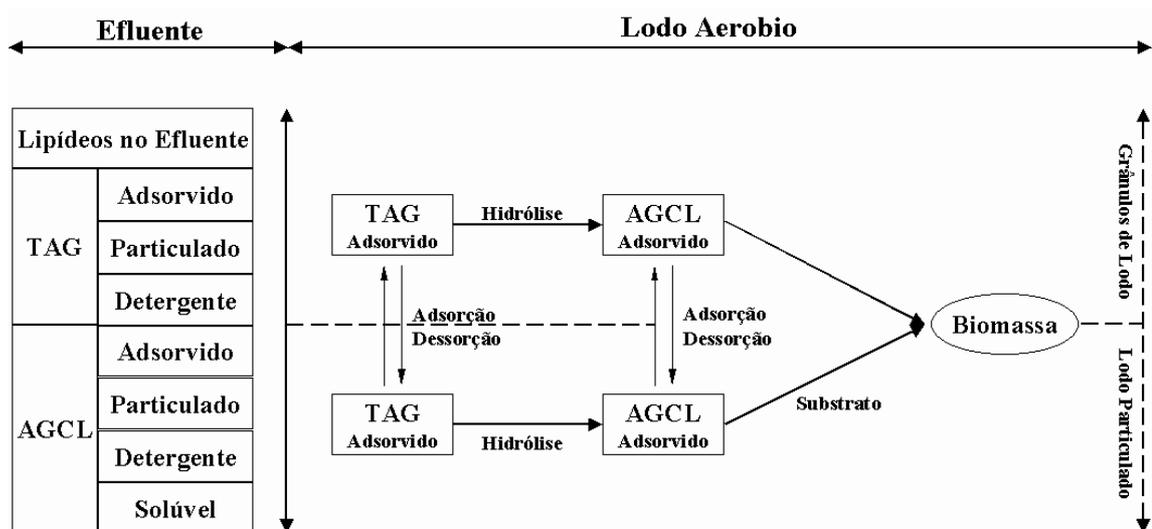


Figura 2.1. Reações envolvidas na transformação de lipídeos em lodo aeróbio.
 Fonte: DUEHOLM *et al.* (2001).

2.3. Problemas Relacionados aos Elevados Teores de Lipídeos no Tratamento Anaeróbio de Águas Residuárias

A hidrólise de lipídeos, etapa limitante na digestão anaeróbia de sólidos (DUEHOLM *et al.*, 2001), presentes em diversos tipos de efluentes (óleos comestíveis, curtumes, matadouros, sorvetes, laticínios e os efluentes domésticos e de restaurantes, entre outros), é devido:

- ao baixo consumo de AGCL pelas bactérias (KOMATSU *et al.*, 1991; QUÉMÉNUER e MARTY, 1994);
- a necessidade de uma pequena concentração de hidrogênio (H_2), formado nas reações de encurtamento da cadeia carbônica dos AGCL. O acúmulo deste gás pode afetar o equilíbrio das reações de decomposição dos AGCL que são termodinamicamente desfavoráveis (NOVAK e CARLSON, 1970; HANAKI *et al.*, 1981).

A acumulação de AGCL pode causar problemas na digestão anaeróbia de efluentes, como toxicidade a microrganismos acetogênicos e metanogênicos (HANAKI *et al.*, 1981; ANGELIDAKI e AHRING, 1992) e a formação de espumas, devido ao acúmulo de ácidos graxos não biodegradados (SALMINEN e RINTALA, 2002). As

etapas simplificadas da biodegradação de lipídeos e de outros compostos encontrados em efluentes, como proteínas e açúcares, são apresentadas na Figura 2.2.

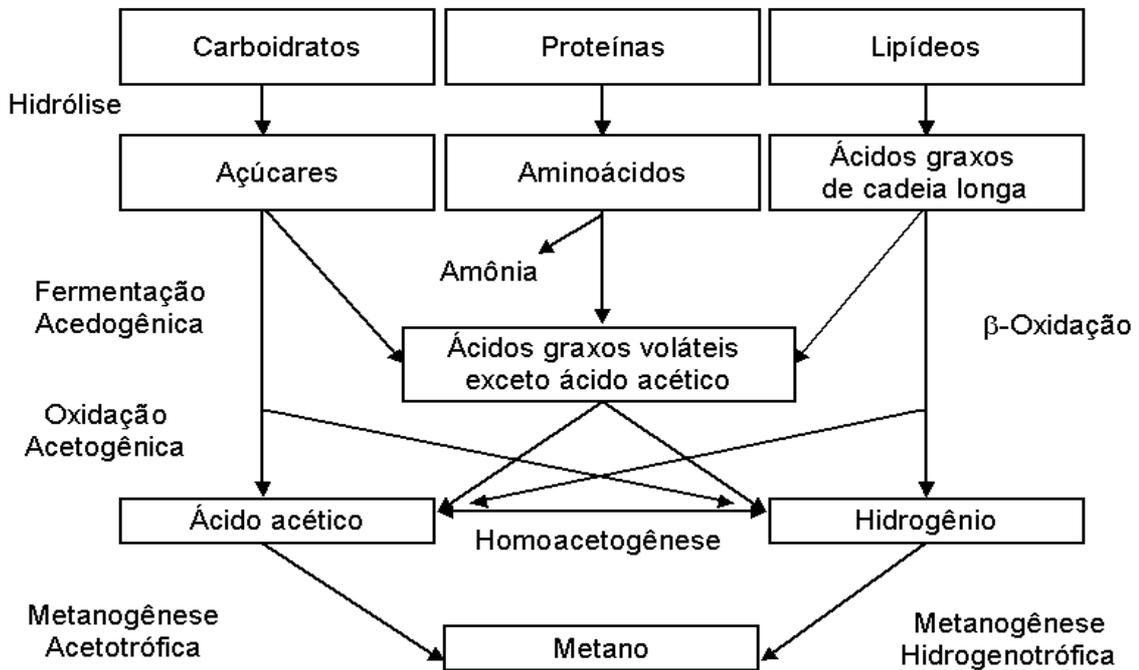


Figura 2.2. Etapas simplificadas de degradação anaeróbica dos componentes orgânicos presentes nos efluentes.

Fonte: PAVLOSTATHIS e GIRALDO-GOMEZ, 1991

Uma grande diversidade de microrganismos está envolvida na degradação anaeróbica de substratos complexos como os encontrados em efluentes das atividades zootécnicas como matadouros, abate de frangos, entre outras.

As condições de processamento e as etapas de operação são fatores que determinam como devem ser tratados esses efluentes. Por exemplo, os sólidos presentes em águas de matadouro, são constituídos de altas concentrações de diferentes proteínas e lipídeos. Bactérias fermentativas particularmente microrganismos do gênero proteolítico *Clostridium*, hidrolisam proteínas a aminoácidos e polipeptídeos, lipídeos a AGCL e glicerol e carboidratos a açúcares e álcoois. Em seguida, as bactérias fermentativas convertem esses intermediários a AGV, hidrogênio (H_2) e gás carbônico (CO_2). Amônia (NH_3) e sulfetos (S^{2-}) são produzidos pela fermentação de aminoácidos. As bactérias acetogênicas convertem os AGCL, AGV com três ou mais carbonos e álcoois superiores ao metanol a ácido acético, H_2 e CO_2 . Essas reações necessitam de uma concentração de

H₂, com pressão parcial da ordem de 10⁻³ atm, para que arqueas metanogênicas e algumas espécies de microrganismos acetogênicos possam degradar esses intermediários. Na etapa final, as arqueas metanogênicas convertem o ácido acético, H₂ e CO₂ a CH₄ e CO₂, como produtos finais (LIN *et al.*, 1997).

Os AGCL são responsáveis, também, pelo decréscimo da concentração de trifosfato de adenosina (ATP), molécula utilizada como fonte de energia pelas células microbianas (HANAKI *et al.*, 1981; PERLE *et al.*, 1995). PERLE *et al.* (1995) estudando o efeito dos lipídeos provenientes de efluentes de laticínios, na redução da atividade metanogênica e concentração de ATP, constataram que a inibição das atividades fisiológicas microbianas é bastante acentuada para efluentes contendo 100mg/L de lipídeos, em termos de produção de biogás. Para efluentes contendo concentrações acima de 500mg/L de lipídeos a produção do gás metano foi nula (Tabela 2.5).

Esses autores observaram também que as proteínas influenciam na atividade celular, testando culturas anaeróbias não-aclimatadas e pré-aclimatadas em caseína e ácido oleico, principais proteína e AGCL presentes em efluentes, respectivamente. As culturas não aclimatadas demonstraram dificuldades na degradação de compostos orgânicos e no comprometimento nas atividades fisiológicas, ao contrário das culturas pré-aclimatadas.

Tabela 2.5. *Influência dos lipídeos na digestão anaeróbia¹, medida pela concentração de ATP e pela atividade metanogênica*

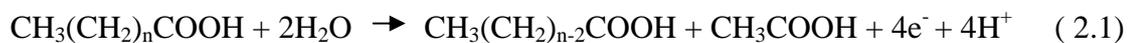
Concentração de lipídeos² (mg/L)	Concentração de ATP nas células anaeróbias³ (mol/L*10⁻⁸)	Biogás produzido no período de 3 dias (mL)
0	17,3	200
100	12,3	100
250	8,93	50
500	8,11	0
1000	7,24	0
1500	5,68	0

¹Concentração inicial de lodo no reator era de 10.990 mg/L.

²Concentração total de matéria orgânica na alimentação, do reator, era de 3000 mg/L.

³Concentração de ATP foi medida num período de 3 dias, depois da adição da gordura de leite. A concentração inicial de ATP do meio de cultura foi de 11,7*10⁻⁸ mol/L.

Dentro das células microbianas, os AGCL são incorporados a complexos lipídicos, como a membrana plasmática ou catabolizados para a formação de compostos de baixa massa molar (CO₂, CH₄ e H₂O). As etapas determinantes, para a oxidação desses ácidos, envolvem em uma série de quatro reações catalisadas por enzimas que clivam dois átomos de carbono por vez, a partir do terminal carboxílico de um ácido graxo. Essa série de reações é repetida para o encurtamento da cadeia do ácido graxo e continua até que todo o ácido seja degradado a acetil-CoA que se converte em ácido acético e, posteriormente, em compostos de baixa massa molar, como produtos finais. A reação de degradação dos ácidos graxos é denominada β-oxidação e o mecanismo é mostrado no esquema 2.1 (WENG e JERIS, 1976):



Para cada molécula de AGCL degradada, é formada uma molécula de ácido graxo com dois átomos de carbono a menos e uma de ácido acético, liberando quatro elétrons e quatro íons hidrogênio. Esses elétrons, transportados no interior das células microbianas como FADH e NADH, são armazenados em aceptores de elétrons para a formação de duas moléculas de gás hidrogênio como apresentado pelo esquema 2.2.



O hidrogênio formado é, então, utilizado por microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos para a formação de metano. Esses microrganismos não sofrem inibição pelos AGCL. Na ausência de outros aceptores de elétrons, como íons sulfato, o ácido acético formado pode ser consumido por microrganismos metanogênicos acetotróficos, pois esses microrganismos também não sofrem inibição pelos AGCL (LALMAN e BAGLEY, 2000).

Em estudos realizados por NOVAK e CARLSON (1970) foi observado que o mecanismo de β-oxidação converteu, seqüencialmente, ácidos graxos saturados como esteárico (C18) para ácidos palmítico (C16), mirístico (C14), láurico (C12), cáprico (C10) e outros a ácido acético, como produto final. Na biodegradação de uma amostra contendo ácidos linoleico, oleico, esteárico, palmítico e mirístico, esses pesquisadores observaram que os ácidos láurico, cáprico, caprílico (C8) e butírico (C4) foram

detectados, em menores concentrações se comparados com o ácido acético, não sendo detectada a presença de ácido capríco (C6). Os ácidos caprílico, capróico e butírico foram detectados em estudos realizados por RINZEMA *et al.* (1994) na degradação de ácido cáprico. Nas etapas de degradação anaeróbia do ácido linoleico foi detectada a formação do ácido oleico (C18:1), o que mostra que o ácido linoleico antes de sofrer a reação de β -oxidação ele foi hidrogenado, reduzindo o número de insaturações, conforme mostrado na Tabela 2.6. Em seguida, o ácido oleico foi degradado para a formação do ácido palmitoleico e, posteriormente a ácido palmítico. Os ácidos palmítico e mirístico foram degradados em concentrações estequiométricas, equivalente a 85-93% molar de ácido linoleico adicionado. Esses pesquisadores concluíram que estes ácidos permaneceram recalcitrantes por um período de 60 dias.

Tabela 2.6. Concentração máxima de produtos formados durante a degradação anaeróbia do ácido linoleico

Ácidos formados ($\mu\text{mol/L}$)	Concentração inicial de ácido linoleico ($\mu\text{mol/L}$)*		
	36	179	357
Esteárico (C _{18:0})	nd ²	nd	nd
Oleico (C _{18:1})	13 \pm 2	30 \pm 1	19 \pm 2
Palmitoleico (C _{16:1})	nd	nd	41 \pm 18
Palmítico (C _{16:0})	13 \pm 2	113 \pm 12	178 \pm 9
Mirístico (C _{14:0})	21 \pm 3	40 \pm 4	127 \pm 14
Láurico (C _{12:0})	nd	nd	<57
Cáprico (C _{10:0})	nd	nd	nd
Caprílico (C _{8:0})	nd	nd	nd
Capróico (C _{6:0})	nd	nd	322 \pm 113
Butírico (C _{4:0})	<57	<57	<57
Acético (C _{2:0})	483 \pm 32	2567 \pm 50	3292 \pm 115

* - 36 $\mu\text{mol/L}$ =10 mg/L, 179 $\mu\text{mol/L}$ =50 mg/L, 357=100mg/L.

nd – não detectado.

Fonte: LALMAN e BAGLEY (2000).

CANOVAS-DIAZ *et al.* (1991) observaram que o ácido mirístico adicionado em concentrações superiores a 1000-3000 mg/L necessitava de um período de 80 dias para ser degradado, enquanto o ácido mirístico formado pela reação de β -oxidação levava 70 dias. LALMAN e BAGLEY (2000) sugeriram que a baixa temperatura adotada na biodegradação anaeróbia de ácido linoleico, 21°C, foi um importante fator na

desaceleração da biodegradação desse composto. A degradação de ácidos acético, propiônico e butírico, em sistemas anaeróbios operando a 55°C, foi completamente interrompida na presença de 100-200 mg/L de ácido oleico e 500 mg/L de ácido esteárico (ANGELIDAKI e AHRING, 1992).

Os AGCL, em concentrações milimolares, podem se tornar inibidores aos microrganismos anaeróbios (HWU *et al.*, 1998), causando flotação da biomassa pela má formação de grânulos de lodo em reatores anaeróbios de fluxo ascendente (UASB) (ALVES *et al.*, 2001), conforme mostrado na Figura 2.3 (SILVA *et al.*, 2002). A flotação do lodo é decorrente da dificuldade de liberação de gases produzidos na digestão anaeróbia (PETRUY e LETTINGA, 1997).

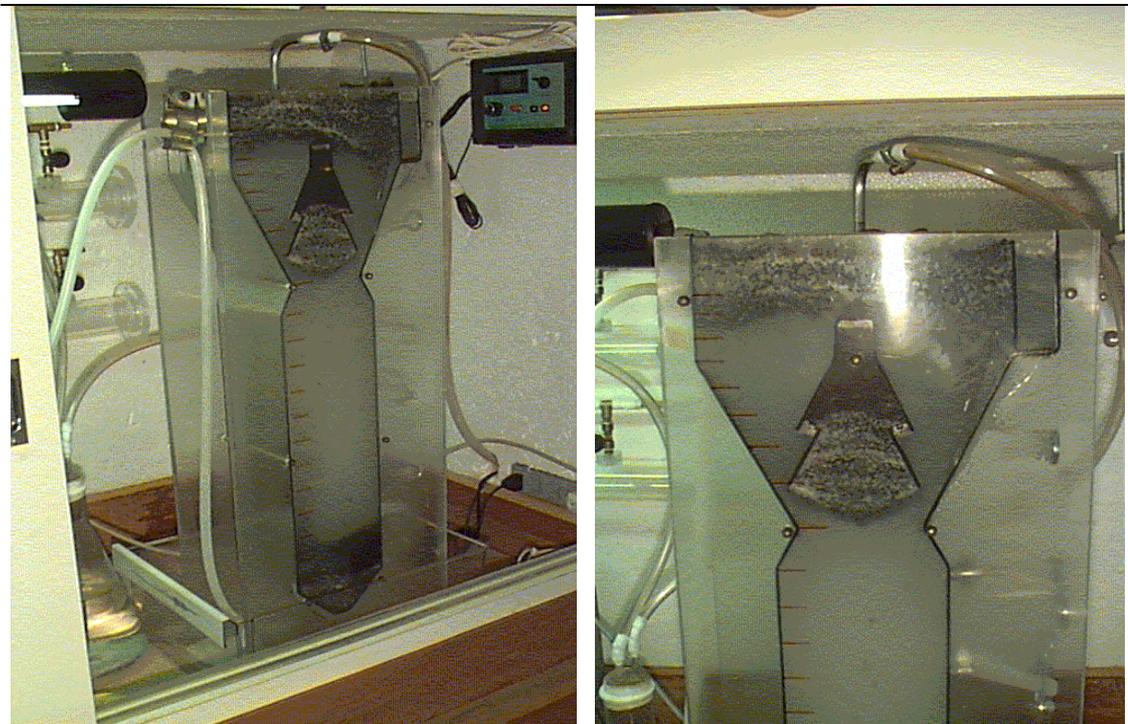


Figura 2.3. Ilustração da colmatação e flotação de lipídeos em reatores UASB após 12 dias de operação.

A definição de adesão microbiana, pelos princípios da termodinâmica, é a energia envolvida na interação bactéria-bactéria ou bactéria-sólido. A interação entre bactérias é compreendida por forças eletrostáticas de van der Waals, interações hidrofóbicas e hidrolíticas (DUEHOLM *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para promover a formação de grânulos em ambientes anaeróbios, com o emprego de matrizes poliméricas

inertes e a suplementação de microrganismos filamentosos (LIU *et al.*, 2003). A inibição depende do tipo de microorganismo, especificamente bactérias, pois as espécies metanogênicas e gram-positivas são mais vulneráveis ao efeito de inibição dos ácidos graxos, comparadas com as gram-negativas (NIEMAN, 1954; ROY *et al.*, 1985). O comprimento da cadeia carbônica e o número de insaturações presentes nos ácidos graxos também são parâmetros de inibição para os microrganismos (KOMATSU *et al.*, 1991; KOSTER e CRAMER, 1987). Ácidos graxos saturados com 12-14 átomos de carbono e ácidos insaturados com 18 carbonos são os ácidos com elevado grau de inibição (NIEMAN, 1954). Estudos realizados por HANAKI *et al.* (1981) mostraram que os AGCL afetam a taxa de produção de hidrogênio produzido pelas bactérias acetogênicas, microrganismos responsáveis pela β -oxidação dos ácidos graxos.

Algumas substâncias como albumina, goma e colesterol podem, entretanto, reduzir a toxicidade dos ácidos graxos, devido à formação de complexos que possam competir com ácidos graxos na adsorção na parede celular (NIEMAN, 1954). Bentonina e cálcio são outras substâncias que podem prevenir o efeito de inibição dos ácidos sobre os microrganismos, porque a bentonina tem poder floculante e o cálcio reage com os ácidos graxos formando precipitados (HANAKI *et al.*, 1981; ROY *et al.*, 1985).

O consumo de hidrogênio por arqueas foi reduzido sensivelmente a 37°C em sistemas reacionais suplementados com gordura de leite contendo ácidos graxos saturados e insaturados (HANAKI *et al.*, 1981).

Esses mesmos autores observaram também o efeito do íon cálcio na redução da inibição dos AGCL, em processo de digestão anaeróbia e concluíram que a adição desse íon reduziu a fase de adaptação dos microrganismos ao meio, devido à formação de compostos insolúveis, Ca-AGCL. O precipitado reduziu o efeito de inibição resultante da redução da concentração de ácidos graxos livres facilitando a adsorção desses ácidos na parede celular microbiana e, conseqüentemente, um aumento no rendimento de produção de biogás (CH₄). Esses autores utilizaram como fonte de cálcio os compostos CaCl₂ e CaCO₃. A adição do CaCl₂ proporcionou resultados satisfatórios por ser um composto solúvel em água, ao contrário do carbonato que é insolúvel.

KOSTER (1987) pesquisou a influência dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e dos íons Ca²⁺ sobre a população de arqueas metanogênicas. O ácido láurico (C_{12:0}) foi utilizado como padrão devido ao elevado potencial de inibição à atividade metanogênica e por ser um dos principais ácidos graxos encontrados em águas

residuárias (KOSTER e CRAMER, 1987). Com uma concentração de 7,5 mM de laurato de sódio, foi observada uma inibição de 94% da atividade metanogênica. Para esse meio de cultura foi utilizado acetato de sódio como fonte de carbono. Após um período de 3 e 20 min de exposição dos microrganismos metanogênicos ao composto laurato de sódio, houve um decréscimo de 40% e 67%, respectivamente, da atividade metanogênica inicial. Por um período de 6 h, apenas 4% da atividade metanogênica inicial permaneceu inalterada. A adição de íon Ca^{2+} após o período de 6 h de exposição não recuperou a atividade metanogênica inicial. Os íons cálcio inibem o efeito inibitório dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), pois eles reagem com esses ácidos na formação de precipitados Ca-AGCL impedindo a interação do ácido graxo com aos microrganismos metanogênicos.

O efeito de inibição dos precipitados de AGCL na atividade microbiana foi estudado por SÄRNER (1981) e SAYED *et al.* (1988) que concluíram que esses precipitados estão relacionados com as limitações de transportes de substratos solúveis para a biomassa devido ao fenômeno de encapsulação de grânulos de lodo. A porção hidrofóbica dos AGCL interage com a parede celular microbiana ocasionando um decréscimo na capacidade de degradação desses substratos.

2.4. Utilização de Enzimas em Tratamento de Efluentes

A utilização de enzimas no tratamento de despejos industriais foi proposta em 1930 (AITKEN, 1993). Entretanto, somente recentemente seu desenvolvimento, como alternativa ao tratamento convencional de efluentes tem despertado grande interesse de pesquisa em função das vantagens apresentadas, entre as quais podem ser citadas (KARAN e NICELL, 1997):

- a taxa de introdução no ambiente de poluentes orgânicos estranhos aos microrganismos e recalcitrantes tem aumentado, o que pode diminuir as possibilidades de se realizar um tratamento convencional biológico ou químico que seja eficiente;
- há um crescente reconhecimento da capacidade das enzimas para atuar sobre poluentes específicos no tratamento;
- avanços recentes na biotecnologia permitiram a produção de algumas enzimas, técnica e economicamente viáveis devido ao desenvolvimento dos procedimentos de isolamento e de purificação de microrganismos.

Enzimas são catalisadores biológicos e seu uso no tratamento de efluentes apresenta várias vantagens potenciais, tais como: simplicidade e facilidade no controle do processo; não há necessidade de aclimação de biomassa; não há efeitos de choque por carga de poluentes; pode ser aplicada em processos com baixa ou alta concentração de poluentes e opera em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade (KARAN e NICELL, 1997).

Entre várias possibilidades, os biocatalisadores podem ser usados no tratamento de efluentes gerados nas indústrias petrolífera, têxtil, papel, derivados de celulose e alimentícias em geral, como mostrado na Tabela 2.7.

A indústria do petróleo é responsável pela geração de grandes quantidades de borras oleosas, as quais representam um considerável dano ambiental. Essas borras consistem de um sistema multifásico contendo óleo, água e sólidos em suspensão, sendo, portanto, de difícil degradação microbiana. A presença de hidrocarbonetos poliaromáticos dificulta a biodegradação deste resíduo. Existem vários tipos de tratamentos, tais como, incineração, aterro, biotratamento, entre outros, mas em alguns casos, os microrganismos não são capazes de suportar a toxicidade do resíduo, sendo necessário um processo alternativo. Assim, a biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos pode ser realizada pelo uso de enzimas oxidativas, como as peroxidases e desidrogenases (BON e PEREIRA JR., 1999).

Na indústria de papel e derivados de celulose, vários estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de viabilizar a utilização de microrganismos e enzimas ligninolíticas (manganês-peroxidase, lignina-peroxidases e lacases) no tratamento de efluentes gerados na etapa de branqueamento, reduzindo o teor de compostos organoclorados das águas residuárias (DE LA RUBIA *et al.*, 2002; LOPÉZ *et al.*, 2002; ROBLES *et al.*, 2002). Similarmente, diversas propostas para tratamento de efluentes gerados na indústria têxtil, empregando as enzimas lacases e catalases, estão em fase avançada de estudos (COSTA, 2002).

Nesse mesmo setor, nos últimos anos, a aplicação de enzimas para a remoção de depósitos nas máquinas de produção de papel vem aumentando consideravelmente. Os contaminantes são proteínas, lipídeos, ceras e materiais lignocelulósicos. Os componentes orgânicos incluem moléculas de açúcares dos extratos de madeira e amidos. A aplicação de enzimas como celulases, proteases, lipases e lignases removem esses sólidos e melhoram o volume de recirculação da água, impedindo a utilização de

materiais poluentes como álcalis e ácidos e com isto reduzem os impactos ambientais nas estações de tratamento de águas residuárias (NOVOZYMES, 2000).

Nas indústrias de abate de frango, um dos principais problemas é a degradação das penas de aves, subproduto do abate de frangos e de difícil biodegradação anaeróbia. As penas são constituídas de queratina, proteína com alto grau de ligações cruzadas entre grupamentos dissulfeto, presentes na cisteína (aminoácido) que confere rigidez à cadeia polipeptídica (SALMINEN e RINTALA, 2002). Estudos têm sido realizados para a obtenção de linhagens capazes de biodegradar essa macromolécula por meio de enzimas proteolíticas, como endopeptidases, obtidas, principalmente, das espécies bacterianas *Fervidobacterium pennavorans* e *Bacillus licheniformis* (SALMINEN e RINTALA, 2002). Uma outra aplicação promissora de enzimas proteolíticas é a hidrólise de proteínas contidas em águas residuárias provenientes, principalmente, das indústrias de laticínios (JUNG *et al.*, 2002a).

Outro exemplo potencial é o uso da enzima tirosinase no tratamento de efluente fenólico como os obtidos em diversas atividades industriais: mineração de carvão, refino de petróleo, curtimento e acabamento de couro, entre outras (BEVILAQUA *et al.*, 2000).

Finalmente ressalta-se o emprego crescente da enzima lipase na limpeza de filmes gordurosos, na biodegradação de blendas poliméricas como poli(ϵ -caprolactona) e poli(acetato de vinila) (SIVALINGAM *et al.*, 2003) e no pré-tratamento de efluentes contendo elevados teores de lipídeos (JAEGER e REETZ, 1998; CAMAROTA *et al.*, 2001; JUNG *et al.*, 2002 b; PEREIRA, 2004).

O uso de enzimas em biocatálise ambiental vem ao encontro da forte tendência dos governos atuais de intensificar as restrições à poluição ambiental. No caso brasileiro, o controle ambiental é ainda mais relevante à preservação dos ecossistemas que, em função da sua extensão e biodiversidade, constitui em ativo de valor incalculável, além de garantir a representatividade brasileira no cenário mundial.

Tabela 2.7. Enzimas com potenciais aplicações em tratamento de efluentes

Enzimas e Fontes	Poluentes e efluentes	Referências
Lipase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (Pancreática – PL250) (<i>Penicillium</i> P4) (<i>Penicillium restrictum</i>) (<i>Yarrowia lipolytica</i>) (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LP ₆₀₂ e <i>Anicetobacter calcoaceticus</i> LP ₆₀₉) (<i>Anicetobacter</i> sp.) (<i>Candida rugosa</i>) (pâncreas de porco)	Redução do teor de lipídeos em efluentes de restaurante 60% de redução do tamanho das partículas de lipídeos (efluente de matadouros) 60% de redução do DQO de efluente da indústria de óleo de oliva. Remoção de DQO de efluente da indústria de derivados lácteos. Redução de DQO, em até 80%, de efluente da indústria de óleo de oliva Redução do teor de lipídeos e DBO de efluente Redução do teor de lipídeos de efluentes de restaurantes Redução do teor de lipídeos e DQO de efluentes de abate de frango Redução do teor de lipídeos de efluentes de derivados lácteos	DHARMSTHITI e KUHASUNTISOOK, 1998 MASSE <i>et al.</i> , 2001 ROBLES <i>et al.</i> , 2000 LEAL <i>et al.</i> , 2002 DE FELICE <i>et al.</i> , 1997 SCIOLI e VOLLARO, 1997 MONGKOLTHANARUK e DHARMISTHITI, 2002 WAKELIN e FORSTER, 1997 PEREIRA <i>et al.</i> , 2003 MENDES <i>et al.</i> , 2004
Azorredutase (<i>Pseudomonas luteola</i>)	Indústrias de tintas	CHEN, 2002
Celulase (<i>Trichoderma harzianum</i>) (<i>Trichoderma viride</i>)	Polpa de açúcar de beterraba Pré-tratamento termoquímico de celulignina	AITKEN, 1993
Cianidase (<i>Fusarium solani</i>)	Cianídeo	BARCLAY <i>et al.</i> , 1998
Cianidase hidratase (<i>Trichoderma</i> spp.)	Cianídeo	EZZI e LYNCH, 2002
Monooxigenase e Iminodiacetato dehidrogenase (gêneros <i>Chelatobacter</i> e <i>Chelatococcus</i>)	Remoção de compostos derivados de ácidos aminopolicarboxilícos (EDTA) em efluentes municipais	BUCHELI-WITSCHERL e EGLI, 2001
Oxirredutases e NTA Dehidrogenase (gêneros <i>Chelatobacter</i> e <i>Chelatococcus</i>)	Remoção de compostos derivados de ácidos aminopolicarboxilícos (EDTA) em efluentes municipais	EGLI, 2001
Polifosfatase e Fosfotransferase	Remoção de fosfato biológico de efluentes	CZERSKA <i>et al.</i> , 1997
Nitrogenase (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	Remoção de excesso de lodo e proteínas em estações de tratamento de efluentes	JUNG <i>et al.</i> , 2002 a
Protease	Cianídeo	KAO <i>et al.</i> , 2003
Protease pronase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Inativação de vírus bacteriófago Cox A9 de efluentes para reutilização da água	NASSER <i>et al.</i> , 2002
Enzimas Oxirredutases (<i>Pseudomonas syringae</i>)	Remoção de compostos fenólicos e catecol	CAZA <i>et al.</i> , 1999

Tabela 2.7. Enzimas com potenciais aplicações em tratamento de efluentes (continuação)

Acetilcolinesterase e enzimas antioxidantes	Degradação de pesticidas de ambientes marinhos	LIONETTO <i>et al.</i> , 2003
Carbaril Hidrolase (<i>Arthrobacter</i> sp. RC100)	Degradação de inseticidas à base de N-metilcarbamato	HAYATSU <i>et al.</i> , 2002
Naftaleno-dioxigenase	Remoção de naftaleno	NIGAM <i>et al.</i> , 1998
Catalase (<i>Bacillus</i> sp.)	Remoção de H ₂ O ₂ presente em efluentes de branqueamento de tecidos	PAAR <i>et al.</i> , 2001
β-Glicosidase e Manganês peroxidase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Pleurotus sajor-caju</i>)	Remoção de corantes azo da indústria de alimentos e na indústria têxtil	CHAGAS e DURRANT, 2001
Lacase (<i>Coriolus versicolor</i> e <i>Funalia trogii</i>) (<i>Trametes versicolor</i>) (<i>Lentinula edodes</i>)	Tratamento de efluentes da indústria têxtil Remoção de pesticidas à base de uréia, N',N'-(dimetil)-N-(2-hidroxifenil)uréia (2-HF) Remoção de compostos fenólicos, polifenóis e orto-difenóis, da indústria de extração de óleo de oliva	KAHRAMAN e GURDAL, 2002 ROBLES <i>et al.</i> , 2002 JOLIVALT <i>et al.</i> , 2000 D'ANNIBALE <i>et al.</i> , 2000
Lacase e Manganês peroxidase (<i>Trametes versicolor</i>) (<i>Panus triginus</i>) (<i>Geotrichum</i> sp. CCM1 1019) (<i>Phanerochaete flavido-alba</i>)	Remoção de hidrocarbonetos aromáticos Remoção de compostos fenólicos da indústria de extração de óleo de oliva Remoção de compostos azo, tintas, presentes em efluentes da indústria têxtil Remoção de compostos fenólicos e cor	EDWARDS <i>et al.</i> , 2003 FENICE <i>et al.</i> , 2003 MÁXIMO <i>et al.</i> , 2003 RUIZ <i>et al.</i> , 2002
Peroxidase Lignina peroxidase (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) Manganês peroxidase (<i>Phanerochaete flavido-alba</i>) Peroxidase de soja	Tintas, clorofenóis, Dibenzo(p)dioxinas, metoxifenóis, metilfenóis, 2-nitrofenol, fenol, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e licor de madeira pinus obtido por explosão à vapor Efluentes de indústrias de extração de óleo de oliva, rico em compostos fenólicos Remoção de compostos fenólicos de efluentes da extração de óleo de soja.	AITKEN, 1993 DE LA RUBIA <i>et al.</i> , 2002 LÓPEZ <i>et al.</i> , 2002; AKAY <i>et al.</i> , 2002
Tirosinase (<i>Agaricus bisporus</i>)	Degradação de compostos fenólicos	SEETHARAM e SAVILLE, 2003

2.5. Lipases

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster- carboxílicas de acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes pobres em água (JAEGER *et al.*, 1994).

A principal aplicação das lipases está relacionada à sua atuação como componente funcional de misturas enzimáticas na formulação de detergentes. A idéia da utilização de lipases neste campo não é nova, mas o grande marco da utilização de lipases na formulação de sabão em pó ocorreu em 1988, quando a empresa Novo Nordisk lançou no mercado um produto contendo lipase fúngica de *Humicola lanuginosa* denominado comercialmente de “Lipolase”. Outros produtos, como o “Lumafast” (Genencor) e o “Lipomax” (Gist Brocades), contêm lipases extracelulares de *Pseudomonas* com estabilidade e atividade ótimas sob as condições de lavagem (JAEGER *et al.*, 1994).

Além disso, as lipases podem ser empregadas na produção de fármacos, cosméticos, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, resolução de racematos, produção de aromas e fragrâncias e modificações de lipídeos (GHANDI, 1997; SHARMA *et al.*, 2001). Na indústria de couro, lipases podem ser empregadas em conjunto com outras hidrolases para a remoção de gordura subcutânea e pelos. Na indústria de polpa e papel, triglicerídeos e ceras contidas na madeira na remoção do “pitch” que dificultam o processo de produção de papel podem ser removidos pelo emprego de lipases (JAEGER e REETZ, 1998).

Atualmente, o tratamento de resíduos também representa um campo de vasta aplicação para estas enzimas, seja na prevenção ou limpeza de filmes gordurosos, seja na biodegradação de plásticos ou seja no pré-tratamento de efluentes contendo compostos gordurosos como os gerados em atividades zootécnicas (LIE e MOLIN, 1991; GROSS, 1996; TEIXEIRA, 2001; MASSE *et al.*, 2001; LEAL *et al.*, 2002; PEREIRA, 2004), sendo essa aplicação objeto do presente projeto.

2.5.1. Fontes e Propriedades

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998). Inicialmente, eram obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (VULFSON, 1994; KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998). Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA, têm permitido aos fabricantes de enzimas colocar no mercado lipases microbianas com uma atividade elevada a um custo mais acessível (VULFSON, 1994).

As enzimas produzidas por fermentação microbiana, são em sua maioria extracelulares, fato que facilita os processos de extração e purificação e conferindo maior estabilidade (JUNG *et al.*, 2002b). A produção de enzimas por via microbiana permite fácil controle das condições de cultivo e pode ser realizada em escala industrial com baixos custos. O rápido crescimento celular é um outro fator importante na produção de enzimas dessa fonte (JAEGER *et al.*, 1999).

As lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras. Uma publicação recente sobre a disponibilidade comercial de lipases listou enzimas de 34 diferentes fontes, incluindo 18 a partir de fungos e 7 de bactérias (JAEGER e REETZ, 1998).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C (VULFSON, 1994).

Lipases pancreáticas têm uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa e são normalmente isoladas de pâncreas ou biles de animais. Por esta razão, são preparações geralmente impuras, contendo outras hidrolases, como esterases, tripsina, proteases, entre outras (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998). As lipases microbianas, mesmo quando são de microorganismos recombinantes, são mais puras.

A atividade lipolítica das lipases pancreáticas é potencializada por diversas substâncias, entre elas Ca^{2+} e alguns aminoácidos e peptídeos. O valor de pH ótimo varia entre 7,5 a 8,0, elevando-se em razão direta do comprimento da cadeia dos ácidos graxos do glicerídeo.

A atividade da hidrólise de glicerídeos pelas lipases pancreáticas aumenta com: massa molecular dos ácidos graxos componentes; grau de insaturação e número de ácidos graxos na molécula do triglicerídeo. Assim, os triglicerídeos de alguns ácidos graxos como o oleico, sofre hidrólise com maior rapidez que os diglicerídeos e os triglicerídeos de ácidos de cadeia curta, tal como o butírico. Em geral, as gorduras são atacadas mais ativamente que outros ésteres de ácidos graxos (MASSE *et al.*, 2001).

Pelo fato das gorduras serem insolúveis na água, a hidrólise pela ação da lipase é facilitada pela emulsificação, que aumenta muito a superfície do substrato exposto a enzima (ROCHA, 1999). A emulsificação é facilitada pelo efeito da diminuição da tensão superficial. Ao separarem-se os ácidos graxos, os monoglicerídios resultantes, e talvez também os sabões (isto é, sais sódicos e potássicos dos ácidos graxos), por serem substâncias tensoativas, facilitam a emulsificação. Às vezes as condições não costumam ser ótimas para que as gorduras ingeridas sofram hidrólise completa desdobrando-se em glicerol e ácidos graxos. A mistura consiste geralmente de gorduras (triglicerídeos), diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos em proporções variáveis, o que depende de diversas circunstâncias, entre elas a quantidade e natureza das gorduras, pH e entre outras (CASTRO *et al.*, 2004).

Entre as lipases pancreáticas disponíveis comercialmente a preparação fornecida pela Sigma (tipo II) é mais bem estudada. No mercado brasileiro, foram também identificadas algumas empresas que comercializam preparações enzimáticas com elevada atividade lipolítica. Porém apresentam um limitado grau de pureza, o que diminui o seu custo. Entretanto, essas preparações não possuem dados de desempenho disponíveis na literatura, tornando necessário um estudo prévio de suas propriedades bioquímicas e cinéticas.

2.5.2. Reações Catalisadas pelas Lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações, mostradas na Figura 2.4 (VULFSON, 1994). Além de clivar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação

reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster) (GANDHI, 1997; YAHYA *et al.*, 1998). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (BALCÃO *et al.*, 1996). Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (YAHYA *et al.*, 1998).

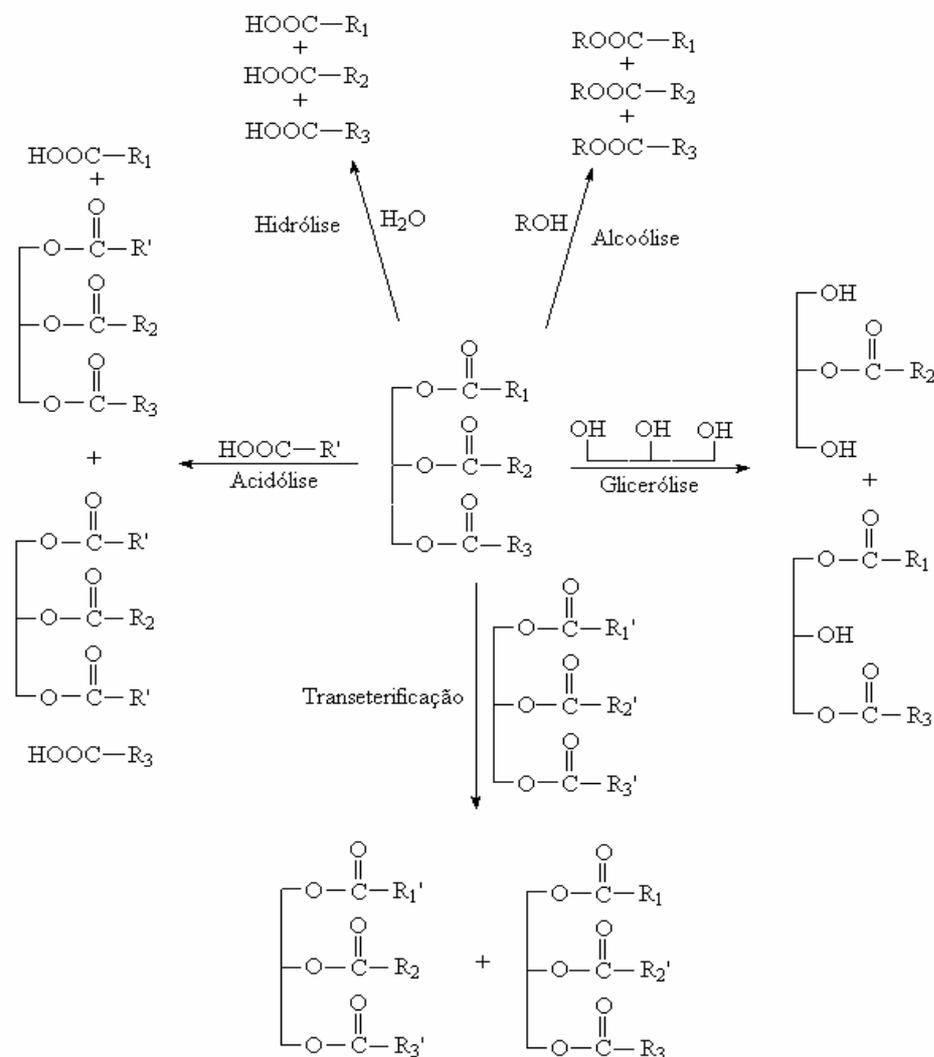


Figura 2.4. Reações catalisadas pelas lipases.
 Fonte: CASTRO *et al.* (2004).

A hidrólise enzimática de lipídeos encontra uma variada aplicação na indústria química e de alimentos. Destacam-se a obtenção de produtos específicos de alto valor agregado, como por exemplo, a astaxantina (corante de alimentos), ácido 4-hidroxicanônico usado como precursor de aromas como o éster γ -decalactona (sabor de frutas), ácidos dicarboxílicos para indústrias de pré-polímeros e ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) do tipo ômega-3 e ômega-6, a partir da hidrólise de óleos marinhos por lipases não específicas (SHARMA *et al.*, 2001). Os mais importantes ácidos, contidos nos óleos marinhos, são os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que apresentam aplicações terapêuticas no tratamento de enfermidades inflamatórias auto-imunes e doenças cardiovasculares, e não podem ser obtidos por métodos convencionais de aquecimento, sem sofrer uma decomposição substancial (TORRES *et al.*, 2003). Da mesma forma, o ácido γ -linolênico, um importante produto nutricional encontrado em sementes de oleaginosas, como soja, milho, canola e girassol, pode ser obtido pela hidrólise catalisada por lipases sob condições moderadas de temperatura.

Em meio orgânico, as lipases são utilizadas em diversos setores da indústria como alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Na indústria alimentícia, a síntese de ésteres apresenta como uma vertente bastante promissora (CASTRO e ANDERSON, 1995). A produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza e qualidade, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilexilpalmitato, são ingredientes empregados na formulação de cremes, cosméticos e outros produtos de higiene. Finalmente merece referência, a produção de ésteres aromatizantes, ésteres de baixo peso molecular, principalmente para o uso em diversos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (VULFSON, 1994).

A interesterificação é o processo mais usado para obtenção de lipídeos com funções desejáveis na manufatura de produtos específicos. Um dos mais importantes usos da lipase, em processos de interesterificação de lipídeos, é o aproveitamento de óleos de baixo custo para produção de análogos de manteiga de cacau (UNDURRAGA *et al.*, 2001). A manteiga de cacau é um ingrediente, que confere ao chocolate as características necessárias de cristalização e fusão. Destaca-se ainda os estudos recentes de aplicação de lipase na geração de energia, como a produção de biodiesel, alternativo ao óleo diesel, a partir de óleos vegetais brutos (PIZARRO e PARK, 2002). Entre essas alternativas, a interesterificação é a melhor escolha, particularmente com monoálcoois

(alcoólise), especificamente metanol ou etanol, promovendo a quebra da molécula dos triglicerídios, gerando mistura de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos correspondentes, liberando glicerina como subproduto (PIZARRO e PARK, 2002).

2.5.3. Mecanismo de Atuação

As lipases têm sido definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são classificadas, genericamente, como esterases (VERGER, 1997).

A diferença entre lipases e esterases também tem sido feita pela especificidade preferencial dessas duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são lipídeos contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular (BROCKMAN, 1984). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases podem hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER *et al.*, 1999).

As reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo, podendo em alguns casos impedir que as cinéticas das reações enzimáticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, as quais só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea (SHARMA *et al.*, 2001). Substratos lipolíticos usualmente formam um equilíbrio entre os estados monoméricos, micelares e emulsificados, resultando na necessidade de um modelo de sistema adequado ao estudo da cinética da lipase. Nos estados monoméricos, as lipases são incapazes de agir, pois os lipídeos se encontram solúveis no meio aquoso. O fenômeno mais conhecido nos estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas é a “ativação interfacial”, a qual relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis emulsificados (JAEGER e REETZ, 1998).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Mucor miehei* e da lipase pancreática humana, propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas encontra-se sob uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença dessa “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a

caracterização de lipases (VERGER, 1997). Recentemente, revelou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial. Lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e a lipase pancreática humana não mostraram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfifílica sobre seus sítios ativos. Esta observação sugere que a presença de uma tampa hidrofóbica sobre o sítio ativo e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como a lipase. Portanto, a definição atual é bastante simples: uma lipase é uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa (JAEGER e REETZ, 1998).

2.5.4. Especificidade

Uma grande vantagem do uso de lipase em relação às reações químicas convencionais reside no fato destas enzimas apresentarem, ou não, especificidade que pode ser dividida em três grupos principais (MACRAE e HAMMOND, 1985; KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998). A Tabela 2.8 mostra as especificidades das lipases e suas aplicações.

1) **Lipases não específicas**: Catalisam a hidrólise completa do triacilglicerídeo em ácidos graxos e glicerol, apresentando mono e diacilglicerídeo como intermediários, atuando de modo aleatório. As lipases de *Candida rugosa*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* pertencem a esse grupo.

2) **Lipases 1,3 específicas**: Na presença dessas lipases, os triacilglicerídeos são hidrolisados nas ligações dos C₁ e C₃ do glicerol produzindo ácidos graxos, 2 monoglicerídeos e 1,2 ou 2,3 diglicerídeos, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil para produzir 1,3 diglicerídeos e 1 ou 3 monoglicerídeos. Pertencem a este grupo as lipases pancreáticas e microbianas de *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar*.

3) **Lipases ácido graxo específicas**: São lipases com ação específica na hidrólise de ésteres cujos ácidos graxos sejam de cadeia longa insaturada com duplas ligações em cis, no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos saturados ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum* usada na alcoólise de óleos selecionados para produtos específicos.

Tabela 2.8. Especificidade das lipases e suas aplicações

Especificidade	Lipase	Aplicação
Regio especificidade		
1,3 regio específica	<i>Mucor miehei</i>	Síntese de triglicerídeos
	<i>Rhizopus oryzae</i>	
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	DG 1,2 (2,3) por hidrólise de TG
	<i>Rhizopus delemar</i>	DG 1,3 por esterificação direta com ácidos graxos
	<i>Rhizopus niveus</i>	
	Lipase pancreática de porco	2-MG por hidrólise de TG 1(3)-MG por esterificação com AG
Não específica	<i>Candida rugosa</i>	Produção de AG por hidrólise
	<i>Chromabacterium viscosum</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MG e DG por glicerólise direta
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	
Especificidade pelo AG		
AG poliinsaturados de cadeia longa	<i>Geotrichum candidum</i>	Hidrólise seletiva
	<i>Candida rugosa</i>	
Ácidos saturados	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hidrólise seletiva
Ácidos insaturados cis- Δ^9	<i>Geotrichum candidum</i> B	Hidrólise seletiva
Ácidos pequenos	<i>Cuphea</i> sp.	Hidrólise seletiva
Acilglicerol específico		
MG	<i>Acilhidrolase de batata</i> (patatin)	MG por esterificação direta com AG
MG e DG	<i>Penicillium camembertii</i>	MG e DG por esterificação direta com AG
	<i>Penicillium cyclopium</i> M1	
	<i>Fusarium</i> sp.	
TG	<i>Penicillium roquefortii</i>	1,2 DG por hidrolase ou alcoólise de TG
	<i>Penicillium cyclopium</i> M1	

2.5.5. Fatores que Interferem no Processo de Hidrólise de Lipídeos

A hidrólise de ésteres de triglicerídeos ocorre por clivagem sequencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma, que num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis (HARALDSSON, 1991), conforme mostrado na Figura 2.5.

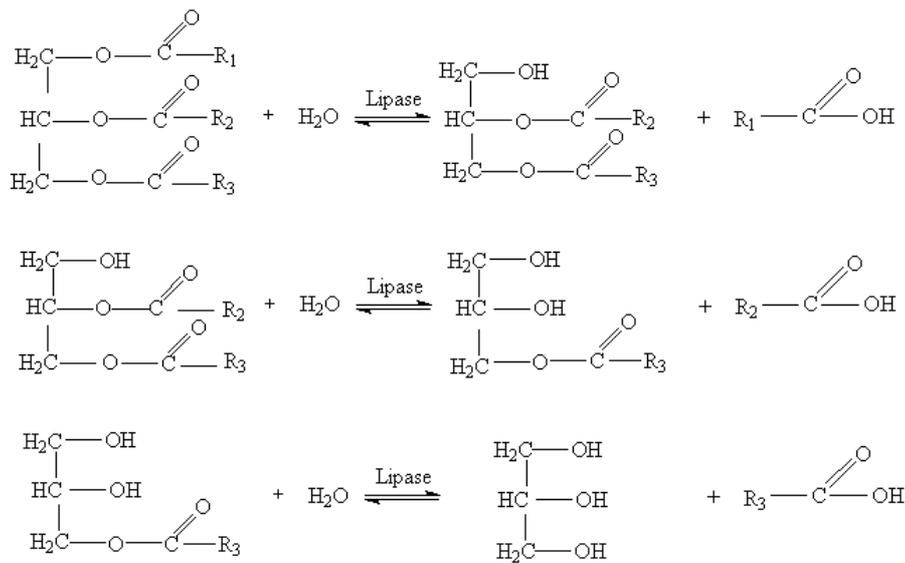


Figura 2.5. Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases. Fonte: CASTRO *et al.* (2004).

Os principais fatores que afetam a atividade das lipases são concentração de substrato, pH, temperatura, agentes emulsificantes e íons (STAUFFERT, 2000).

2.5.5.1. Concentração de Substrato

A velocidade de uma reação catalisada por enzimas aumenta conforme a concentração de substrato, até atingir uma velocidade máxima. A obtenção de um platô na velocidade de reação em altas concentrações de substrato reflete a saturação pelo substrato de todos os sítios de ligação disponíveis na enzima (CHAMPE e HARVEY, 1997). A relação entre a velocidade da reação e concentração crescentes de enzima, na presença de um excesso de substrato, é suficiente para saturar o sítio ativo da enzima (CONN e STUMPF, 1980). No caso específico das lipases, sua atuação em sistemas

heterogêneos, é proporcional a concentração de emulsão. Em baixas concentrações ocorre um decréscimo de adsorção de lipase na interface água/óleo, resultando na redução da atividade hidrolítica, não ocorrendo o mesmo em sistemas com elevada concentração de emulsão (VERGER, 1997).

2.5.5.2. Efeito do pH

A mudança de pH afeta profundamente o caráter iônico dos grupos carboxílicos e amino da enzima e afeta, portanto o sítio catalítico e a conformação de uma enzima (CONN e STUMPF, 1980).

A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima, chamado pH ótimo da enzima e acima ou abaixo desse pH a atividade decresce. O pH ótimo está associado ao tipo de substrato, estado de pureza da lipase, tampão e métodos de ensaio. Entretanto, grande parte das lipases tem uma atividade ótima em pH alcalino (CHAMPE e HARVEY, 1997). A lipase de pâncreas de porco tem uma atividade ótima em pH entre 8 e 9 mas, dependendo do substrato e do tipo de agente emulsificante, pode desenvolver atividade em pH entre 6 e 7 (SHAHANI, 1975).

2.5.5.3. Temperatura

A velocidade de reação aumenta com a temperatura até atingir a velocidade máxima. O aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas de enzima e substrato, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. Uma elevação adicional da temperatura resulta em uma redução na velocidade de reação, como resultado da desnaturação da enzima induzida pela temperatura (CHAMPE e HARVEY, 1997).

As enzimas são moléculas proteicas complexas e sua atividade catalítica provém de uma estrutura terciária, mantida, principalmente, por interações fracas. O aumento da temperatura promove um rearranjo da estrutura terciária da enzima, tornando a molécula desnaturada. A temperatura ótima das lipases microbianas e pancreáticas se encontra normalmente entre 30-40°C (SHAHANI, 1975).

2.5.5.4. Agentes Emulsificantes

Os agentes emulsificantes são moléculas anfifílicas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfótera (ROCHA, 1999). Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) e os surfactantes não-iônicos incluem Triton X, Triton N e o Brij. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) (GAN *et al.*, 2000).

A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes. Estas propriedades fazem com que os surfactantes sejam adequados para uma ampla gama de aplicações industriais incluindo: emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (ROCHA, 1999).

A reação padrão mais utilizada na determinação da atividade lipolítica, é a hidrólise dos triacilgliceróis com a quantificação dos ácidos graxos formados. Os métodos mais usados para acompanhar esta reação são a titulação com hidróxidos (PELED e KRENZ, 1981) e a colorimetria com sais de cobre (LOWRY e TINSLEY, 1976). Esta última metodologia pode também ser usada com sistemas micelares, com especial atenção ao efeito do tensoativo (caso do AOT) no estabelecimento das curvas de calibração (WALDE, 1990).

Uma das principais dificuldades na compreensão do mecanismo de hidrólise é a dependência da atividade das lipases das propriedades físicas da emulsão, ou seja, a disposição de substratos lipolíticos à lipase (BROCKMAN, 1984). O uso de substratos solúveis em água, tais como o p-nitrofenil palmitato (pNPP), cuja hidrólise é rápida e pode ser acompanhada espectrofotometricamente, não é, contudo, o mais adequado para a determinação da atividade da lipase, devido a interferência de esterases (ERDMANN *et al.*, 1990). O método mais utilizado para determinar a atividade das lipases é a titulação dos ácidos graxos formados pela hidrólise do triglicerídeo, em geral, a trioleína, produzidos numa emulsão estabilizada com um agente tensoativo. Apesar do efeito dos agentes emulsificantes em lipases não ter sido extensivamente estudado, a

goma arábica é o agente tensoativo mais utilizado, conduzindo elevada atividade lipolítica (VEERARAGAVAN, 1990). Os tensoativos iônicos não são empregados em hidrólises de lipídeos, quando se utiliza o método titrimétrico como método analítico, pois podem deslocar o equilíbrio iônico.

Entre os tensoativos não iônicos, o Triton X-100 é o mais utilizado em ensaios de hidrólise de triglicéridios (PELED e KRENZ, 1981; ERDMANN *et al.*, 1990; ROCHA, 1999). O uso de tensoativo para estabilizar emulsões na determinação de atividade lipolítica, deve ter em conta que a atividade da lipase varia tanto em função do tipo de tensoativo, como da sua concentração (MOZAFFAR *et al.*, 1994). Assim, as atividades enzimáticas só são comparáveis quando se usa o mesmo tensoativo, na mesma concentração, em todos os ensaios (ROCHA, 1999). O efeito dos tensoativos sobre a atividade hidrolítica das lipases (ativação ou inibição) é particularmente importante na indústria de detergentes, onde as lipases são usadas na remoção de lipídeos (XIA *et al.*, 1996).

2.5.5.5. Efeito dos Íons

Os sais exercem uma influência na atividade enzimática das lipases, podendo aumentar ou reduzir a sua ação hidrolítica. Dependendo da fonte de lipase, existem diferenças dos íons Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- e sais biliares. No caso da lipase de pâncreas de porco, o NaCl parece ser essencial em concentrações em torno de 7 mM, na qual mostra um máximo de atividade. Para concentrações superiores a 7 mM a velocidade da reação decresce. É possível que o NaCl promova a ionização do ácido graxo em pH alcalino. Outras lipases como a do pâncreas bovino, não mostram essa necessidade (SHAHANI, 1975).

Lipases de *Geotrichum candidum* mostraram também ser dependentes de Ca^{2+} e Na^+ (MACEDO, 1995). Na hidrólise do óleo de oliva, a atividade hidrolítica foi reduzida em 38% sem adição desses íons no meio da reação. Com lipase de *Penicillium roquefortii*, nesse mesmo trabalho, foi observado que os íons K^+ e Na^+ até a concentração de 1 mM, e os íons Mn^{2+} e Ca^{2+} promoveram um incremento na atividade, ao contrário do íon Fe^{3+} que reduziu severamente a atividade de hidrólise.

Em estudo com lipases de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 foi observado que os sais de sódio e potássio também incrementaram a atividade enzimática na concentração de 1mM (LIN *et al.*, 1996). Os cátions bivalentes Ca^{2+} e Mn^{2+} elevaram a

atividade hidrolítica dessa lipase, ao contrário dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} . Os metais pesados e os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} inibem a atividade hidrolítica das lipases, pois esses íons podem alterar a conformação do sítio ativo da lipase (SHARON *et al.*, 1998). CHARTRAIN *et al.* (1993) observaram o efeito de inibição da lipase extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 em meios com concentração de 1 mM de ZnSO_4 , com 94% de inibição, mas sua atividade hidrolítica foi estimulada pela adição de 10 mM de CaCl_2 e 200 mM de ácido taurocólico (sal de bÍlis).

2.5.6. Aplicação de Lipases em Tratamento de Efluentes Ricos em LipÍdeos

As lipases vêm sendo utilizadas na remoção de gorduras nos aeradores de estações de tratamento que empregam sistemas de lodos ativados (JUNG *et al.*, 2002, b). Esta camada de gordura impede a transferência de oxigênio, comprometendo a reposição de oxigênio necessário à biomassa na degradação da matéria orgânica. A empresa japonesa Meito Sangyo Co. vem produzindo lipase de *Candida rugosa* (Lipase-MY), para o emprego em estações de tratamento de efluentes nos Estados Unidos na remoção de gorduras impregnadas em equipamentos (SEITZ, 1974). O tempo de vida útil de equipamentos industriais e de estações de tratamento de efluentes aumenta com a remoção de sólidos, como gorduras.

As lipases podem ser utilizadas diretamente na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas para promover um pré-tratamento do efluente antes da digestão anaeróbia. Entretanto, estudos têm sido realizados para verificar a possibilidade de cultivo de microrganismos produtores de lipases do gênero *Penicillium* em associação com a digestão do efluente de extração de azeite de oliva (ROBLES *et al.*, 2000).

Um complexo enzimático contendo hidrolases, como proteases, amilases, celulasas e lipases, produzidas por *Bacillus subtilis*, foi testado em efluentes ricos em lipÍdeos por CAIL *et al.* (1986). O pré-tratamento enzimático aumentou a remoção de DQO de 59% no controle para 78%, no reator anaeróbio e reduziu os teores de lipÍdeos e sólidos de 47 para 70% e de 34 para 70%, respectivamente.

Um pré-tratamento enzimático de efluentes de matadouro foi realizado por MASSE *et al.* (2001) empregando três preparações de lipases de fontes animal, lipase pancreática 250 (PL-250, Genencor International, Rochester, NY), microbiana de *Mucor miehei* G-1000 (LG-1000 Genencor International, Rochester, NY) e vegetal, denominada EcoSystem Plus (ESP, Neozyme International, Newport Beach, CA) para

avaliação da redução de DQO e do tamanho de partículas de lipídeos. Os resultados obtidos mostraram que a lipase pancreática PL-250 foi mais eficiente que as demais, com uma redução no tamanho das partículas de lipídeos em até 60% em um período de 4 h. Por outro lado, os autores não obtiveram redução significativa de DQO devido ao fenômeno de dessorção/ adsorção da lipase na superfície das partículas de lipídeos.

A espécie *Penicillium* P₄, isolada de um efluente de uma indústria de óleo de oliva, foi estudada para biodegradação deste efluente, contendo 114000 mg/L de DQO (ROBLES *et al.*, 2002). Após 20 dias de incubação, a 28°C, observou-se uma redução de 61% na DQO inicial do efluente.

O crescimento da levedura *Yarrowia lipolytica* da linhagem ATCC 20255 em efluentes da indústria de óleo de oliva, utilizando lipídeos e açúcares como fontes de carbono, foi estudado por DE FELICE *et al.* (1997). Após um período de 24 h, em sistema aeróbio, a redução de DQO foi de 80% e a concentração de biomassa aumentou em 22,45 g/L, comparada com a concentração microbiana inicial. Resultados similares foram descritos por SCIOLI e VOLLARO (1997).

Uma cultura mista de bactérias das linhagens *Pseudomonas aeruginosa* LP₆₀₂, *Bacillus* sp. B₃₀₄ e *Anicetobacter calcoaceticus* LP₆₀₉ foi testada no tratamento de efluentes ricos em lipídeos por MONGKOLTHANARUK e DHARMISTHITI (2002). Nesses testes, a linhagem B₃₀₄ foi responsável pela produção das enzimas protease e amilase e as linhagens LP₆₀₂ e LP₆₀₉, pela produção de lipases. Os valores de DBO e teor de lipídeos, empregando o consórcio bacteriano, foram reduzidos de 3500 e 20000 g L⁻¹, respectivamente, para valores inferiores a 20 mg L⁻¹, sob condições aeróbias num período de 12 dias.

A remoção de lipídeos de efluentes gerados em restaurantes foi verificada por WAKELIN e FORSTER (1997) empregando culturas puras das espécies *Anicetobacter* sp., *Rhodococcus rubra*, *Nocardia amarae*, *Microthrix parvicella*, uma cultura mista chamada MC1 e lodo ativado aclimatado e não aclimatado. A espécie *Anicetobacter* sp. foi a mais eficiente das culturas puras, removendo 60-65% do teor de lipídeos, com uma concentração inicial de 8000 mg/L. A eficiência, de remoção de lipídeos do efluente, pela cultura mista MC1 foi de 73%. Em lodo ativado aclimatado, foram obtidas eficiências de remoção de lipídeos superiores a 90%. Esse valor não foi observado pelo lodo não aclimatado. Para todos os meios de cultura a fase lag, fase de adaptação ao meio, foi de aproximadamente 1 dia, exceto para o lodo ativado aclimatado. Os testes de

biodegradabilidade de lipídeos foram efetuados em período de 7-8 dias. A ausência desta fase lag, para o lodo ativado aclimatado, resultou em maior remoção de lipídeos e um rápido crescimento dos microrganismos do meio de cultura, devido à maior assimilação do substrato pelos microrganismos.

A hidrólise enzimática com lipases produzidas pelo *Penicillium restrictum*, anterior à etapa biológica em um reator de lodos ativados de batelada seqüencial para o tratamento de efluentes de laticínios foi investigada por JUNG *et al.* (2002, b). A hidrólise do efluente foi conduzida com 0,2 % (m/v) de torta de babaçu fermentada com atividade lipásica de 11 U/g de sólido. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação. Diferentes concentrações de lipídeos foram avaliadas (400, 600 e 800 mg/L). Os reatores foram alimentados com efluente bruto (controle) ou hidrolisado e operaram à temperatura ambiente e com tempo de retenção hidráulica de 24 h. Até a concentração de 600 mg/L, a flora microbiana assimilou a carga orgânica introduzida em ambos os reatores. A partir de 800 mg/L, a eficiência de remoção de DQO no reator controle decaiu, chegando a ser nula, enquanto no reator alimentado com o hidrolisado se manteve acima de 90%.

A hidrólise de lipídeos de efluentes gerados em frigoríficos avícolas, empregando lipase microbiana de *Candida rugosa* foi realizada por PEREIRA *et al.* (2003). As porcentagens de hidrólise mais elevadas foram alcançadas em efluentes tamponados no pH ótimo de atuação dessa preparação enzimática (pH 7,0). Verificou-se a influência das concentrações de enzima, agente emulsificante e íons cálcio no desempenho da hidrólise dos lipídeos, por meio de um planejamento fatorial. A porcentagem de hidrólise máxima obtida foi de 20,9 %, com influência significativa, em níveis máximos, das concentrações de enzima (0,4%) e agente emulsificante (3%). O ajuste do pH do efluente com soluções de NaOH ou NaHCO₃ em substituição a solução tampão e após 12 h de tratamento, elevou a porcentagem de hidrólise dos lipídeos para 35%. A eficiência do pré-tratamento enzimático, verificada por meio de testes de atividade metanogênica revelou uma redução no tempo de digestão anaeróbia da ordem de 33%.

São também conhecidos diversos documentos de patentes que tratam de maneira diversificada a aplicação de enzimas hidrolíticas, principalmente lipases, na hidrólise de compostos orgânicos contidos em efluentes.

A patente FR2659645, depositada em 13/03/90, relata um procedimento para a degradação de lipídeos, contidos em caixas de gorduras de efluentes domésticos, pela adição de bactérias produtoras de lipases (TSOCHOCKE, 1990). Essas bactérias são fixadas e confinadas em um material suporte não-biodegradável e imersas na superfície das caixas de gordura, obtendo porcentagem de hidrólise superior a 90%.

Um método de tratamento para efluentes com elevados teores de lipídeos e/ou materiais amiláceos, fécula, a partir de um bioaditivo constituído de diversas linhagens microbianas é relatado pela patente FR2684664, depositada em 10/12/91 (GARDON *et al.*, 1991). Esse bioaditivo é produzido por fermentação aeróbia, de culturas enriquecidas com as espécies microbianas *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas biazotea*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Pseudomonas desnitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* e *Rhodopseudomonas palustris*, sais minerais, substrato e água, com controle de oxigênio e reciclagem permanente do conteúdo do fermentador. A cultura obtida é transferida para uma caixa de gordura aerada, que possui elementos de biofixação em seu interior para facilitar a eliminação de produtos inibidores da fermentação. A concentração de bactérias na caixa de gordura é controlada pela vazão de alimentação proveniente do fermentador e mantida entre 10^7 a 10^{10} bactérias/mL, por um período de 12 a 72 h sob uma concentração de oxigênio de 4 a 8 ppm.

O emprego de uma formulação composta por emulsificantes e enzimas protease, amilase, lipase, celulase e pectinase, para a separação de lipídeos de águas de lavagem de máquinas industriais é relatado pela patente US5459066 depositada em 17/10/95 (BRUNO, 1995). Esse complexo enzimático é empregado na forma comercial (Amerzyme-A-100, Applied Biochemists-E.U.A) ou em diferentes combinações. As espécies microbianas contidas nesse complexo enzimático são *Bacillus subtilis*, produtoras de protease e amilase e *Aspergillus niger*, produtoras de lipase, celulase e pectinase. As enzimas são aplicadas em concentrações que variam entre 1 e 200 ppm.

O documento US5464766, depositado em 07/11/95, refere-se a uma formulação pulverizada de bactérias/enzimas para o tratamento de rejeitos orgânicos contidos em fossas sépticas, boeiros, latões de lixo e tubulações de esgotos por meio de digestão biológica (MARK, 1995). Essa formulação é composta por enzimas, estabilizantes e ativadores de enzimas, bactérias aeróbias e anaeróbias não patogênicas do gênero *Bacillus*, nutrientes, tampões, emulsificantes e agentes quelantes para a remoção de

metais pesados. Proporções menores que 26%, em peso, são recomendadas de acordo com o tipo de rejeito.

O documento WO9609772, publicado em 04/04/96, refere-se ao tratamento de rejeitos contendo amido e lipídeos, provenientes da indústria de alimentos (MAR e MARIUS, 1996). Esses rejeitos são subprodutos fora da especificação para consumo humano, mas com valor agregado. O amido pode ser reaproveitado industrialmente e o conteúdo de lipídeos removido por meio de um tratamento enzimático empregando lipases.

O documento de patente BR0007101-3A, depositado em 16/10/00, refere-se à utilização de hidrolases como lipase, protease e amilase, produzidas pelo fungo *Penicillium restrictum* em fermentação semi-sólida de rejeitos da indústria de óleo de babaçu, para tratamento anaeróbio de efluentes com uma concentração de lipídeos que varia entre 180-1200 mg/L (CAMMAROTA *et al.*, 2002). A aplicação de enzimas hidrolíticas, anterior ao tratamento anaeróbio, resultou no aumento de remoção de DQO de 1,3-4,2 vezes, em relação ao efluente bruto. Esse preparado enzimático é utilizado também na limpeza de fossas sépticas, caixas de gorduras residenciais e de estabelecimentos comerciais e recuperação de reatores aeróbios e anaeróbios.

Desta forma, pode-se afirmar que a enzima lipase tem uma grande potencialidade para o tratamento de efluentes gordurosos tendo em vista a sua grande especificidade e a capacidade de hidrolisar os lipídeos presentes nesses efluentes.

Para viabilizar economicamente este tipo de tratamento, alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados. É necessário conhecer em detalhes os processos industriais responsáveis pela produção dos efluentes: suas variações ao longo do tempo, os insumos empregados, o regime de descarga dos efluentes, o procedimento para a limpeza das instalações, sua frequência e produtos utilizados para esse fim. Todos esses detalhes operacionais podem influenciar na qualidade dos efluentes. É necessário também fazer uso de preparações enzimáticas ativas e otimizar as condições adequadas de hidrólise.

2.6. Efluentes da Indústria de Produtos Lácteos

Os efluentes das indústrias de laticínios abrangem os efluentes líquidos industriais, os esgotos sanitários gerados e as águas pluviais captadas na respectiva indústria. As águas de refrigeração e as águas de caldeiras não são geralmente

consideradas como águas residuárias, tendo em vista que o seu uso costuma ser feito em sistema de recirculação (MACHADO *et al.*, 1999). Os constituintes presentes no efluente industrial incluem: substâncias orgânicas associadas ao leite, como lipídeos, proteínas e carboidratos; detergentes e desinfetantes usados nas operações de lavagem e sanitização; areia e poeira removidas nas operações de lavagens de pisos e latões de leite e lubrificantes empregados em determinados equipamentos. Podem ainda estar presentes ingredientes como açúcar, pedaços de frutas, essências, condimentos diversos, subprodutos como o soro (produção de queijo) e o leiteiro (produção de manteiga). A composição dos efluentes da indústria de laticínios em geral, sem especificação de produtos obtidos, é mostrada na Tabela 2.9.

Tabela 2.9. Características dos efluentes da indústria de derivados lácteos

Características	Média	Faixa
DBO ₅ (mg/L)	2300	40-48000
DBO ₅ (g/kg leite processado)	5,8	0,2-71,0
DQO (mg/L)	4500	80-95000
DBO ₅ /DQO	0,53	0,11-0,90
pH	7,2	4,5-9,4
Lipídeos (mg/L)	300	70-700
Sólidos totais (mg/L)	2450	135-85000
Sólidos em suspensão (mg/L)	816	24-4500
Sólidos voláteis totais (mg/L)	1093	6-5360
Nitrogênio total (mg/L)	56	15-180
Fósforo (mg/L)	33	12-132
Cloreto (mg/L)	200	48-559
Volume de efluente (L/kg leite)	2,5	0,09-7,2
Temperatura (°C)	32	18-52

DBO₅-Demanda Bioquímica de Oxigênio no período de 5 dias.

Fonte: HARPER (1974).

Os despejos líquidos poluentes têm origem na lavagem e/ou enxágüamento de latões de leite, tanques, tubulações de leite, mangueiras de soro, bombas, equipamentos, utensílios utilizados diretamente na produção, pisos e paredes; nos vazamentos de leite em tubulações e equipamentos correlatos, inclusive pasteurizadores e evaporadores; nas descargas de misturas de sólidos de leite e água por ocasião do início e interrupção de

funcionamento de pasteurizadores, trocadores de calor, separadores e evaporadores e no descarte de soro, leite e leite ácido nas tubulações de esgotamento de águas residuárias.

A vazão e o volume dos efluentes estão intimamente relacionados ao volume de água consumido pelo laticínio. O valor da relação entre o volume de efluentes líquidos e o volume de água consumida pelos laticínios costuma situar-se entre 0,75 e 0,95 (STRYDOM *et al.*, 1997). Em Planos de Controle Ambiental, apresentados à Fundação Estadual do Meio Ambiente de Minas Gerais (FEAM), o valor desse coeficiente varia entre 0,89 e 0,96 (MACHADO *et al.*, 1999).

Apesar da similaridade com os esgotos domésticos, os efluentes de laticínios apresentam algumas características que merecem consideração especial, como: ampla variação de vazão, carga orgânica, composição, temperatura, pH e alta demanda de oxigênio inicial. Portanto, em relação aos esgotos domésticos, estes são consideravelmente mais concentrados e mais rapidamente degradáveis.

A Tabela 2.10 mostra a composição de efluentes de indústrias de laticínios (MACHADO *et al.*, 1999). Observa-se que os parâmetros variam em função dos produtos industrializados.

Tabela 2.10. Caracterização de efluentes de laticínios de acordo com os produtos beneficiados

Produtos	Valores em mg/L						pH
	DBO	DQO	SST	SSV	NKT	OG	
Queijo, leite em pó e creme	1900	3390	850	760	130	290	6-7
Queijo, sorvete, creme e iogurte	4800	12000	400	-	-	-	4-12
Leite pasteurizado, iogurte, manteiga e queijo	500-1300	950-2400	90-450	-	70-85	110-260	5-9,5
Leite pasteurizado e creme	1200-4000	2000 – 6000	350-1000	330-940	50-60	300-500	8-11

Fonte: MACHADO *et al.* (1999).

Dois aspectos devem ser considerados na implantação de sistemas de tratamento de efluentes de laticínios. O primeiro é que o soro e o leite devem ser considerados como insumos que podem ser utilizados para o processamento de inúmeros outros

produtos, e não devem ser admitidos nas estações de tratamento de efluentes para não elevar os custos para implantação e operação, além de prejudicar o bom funcionamento do reator biológico. O segundo aspecto refere-se às diversas medidas de controle de produção que devem ser adotadas pelos laticínios com o intuito de reduzir a carga orgânica do efluente e o consumo de água, estando este último geralmente acima do recomendado (TEIXEIRA, 2001).

O impacto ambiental dos efluentes da indústria de laticínios deve-se principalmente ao elevado teor de matéria orgânica dos subprodutos como soro de queijo, leite ácido e o leitelho que em sua maioria não são aproveitados, configurando um desperdício inaceitável.

Por esta razão, os processos biológicos são os mais convenientes, se uma escolha tem que ser feita entre os diferentes tipos de processos que podem ser empregados para tratar este tipo de efluente. Surge assim neste contexto, o emprego de bactérias e enzimas especializadas, para uma solução puramente biológica - Bidespoluição. Esta é considerada um avanço da biotecnologia, que ocasionou o surgimento das chamadas "tecnologias inovativas de tratamento" que são tecnologias de processo aplicadas ao tratamento de resíduos orgânicos, no estado sólido ou líquido, que terão suas propriedades físico-químicas alteradas, o que propicia sua adequação para lançamento aos corpos receptores, respeitando a legislação vigente e bem como a sua adequação as normas de qualidade ambiental (ISO 14000).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

Foram utilizadas preparações de lipases comerciais de origem animal (pâncreas de porco (LPP) adquirida da empresa Sigma Co (EUA), pancreatina 6NF (LKM), gentilmente fornecida pela empresa Kin Master/ RS e pancreatina (LNU) adquirida da empresa Nuclear/SP.

3.1.2. Efluentes

Como substratos, foram utilizados soro de queijo gerado na produção de queijo tipo Minas no Laboratório de Biocatálise/ FAENQUIL e efluente da indústria de derivados Lácteos Cooperativa Maringá (Guaratinguetá-SP), coletado em um único ponto antes de ser conduzido a Estação de Tratamento (flotador). Tanto o soro de queijo como o efluente foram estocados em recipientes plásticos de 1 litro limpos não esterilizados e armazenados em freezer a 0°C, para conservação das suas características.

3.1.3. Lodo Anaeróbio

Todos os testes de biodegradabilidade foram efetuados com lodo anaeróbio aclimatado da indústria de derivados lácteos DANONE (Guaratinguetá-SP), proveniente de um reator UASB com capacidade operacional de 60 m³/h. O lodo foi estocado em recipientes de vidro cor âmbar de 1 litro e armazenados a 25°C.

3.2. Caracterização das Propriedades Cinéticas e Bioquímicas das Preparações de Lipases

3.2.1. Determinação da Concentração de Proteína

O teor de proteína das amostras de preparações enzimáticas comerciais foi dosado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Este método foi o selecionado em função de não sofrer interferências significativas de cátions e carboidratos, presentes em algumas das amostras de enzimas. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para

construir a curva de calibração na faixa de 0 a 0,1 mg/mL, como apresentado no Apêndice 8.1.A.

3.2.2. Determinação da Atividade Lipolítica

A atividade lipolítica das preparações enzimáticas foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva, conforme metodologia adotada por SOARES et al (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50 g de azeite de oliva e 50 g de goma arábica a 7% (m/m). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL da solução enzimática (5 mg sólido/ mL). Os frascos foram incubados a 37°C por 5 min, em banho termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela equação 3.1 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Em paralelo, foi realizado um controle utilizando azeite de oliva emulsificado sem a adição de enzimas. As atividades foram expressas em µmoles/mg.min (U).

$$U \text{ (umoles/mg.min)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^6}{t \cdot m} \quad (3.1)$$

Em que: M = Concentração molar da solução de KOH; m = Massa de enzima (mg); t = Tempo de reação (min); V_a = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_b = Volume do KOH gasto na titulação do branco (mL).

3.2.3. Influência do pH

A atividade das lipases testadas foi estudada utilizando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva na faixa de pH entre 5,0 a 9,0 com incremento de 0,5. Para este estudo foi empregada a metodologia descrita no item 3.2.2 variando o pH do tampão fosfato de sódio (0,1 M) na temperatura de 37°C (SOARES *et al.*, 1999).

3.2.4. Influência da Temperatura

Foi verificada a influência da temperatura sobre a atividade das lipases empregando a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita no item 3.2.2, na faixa de temperatura entre 30 a 60°C (SOARES *et al.*, 1999).

3.2.5. Estabilidade Térmica

O efeito da temperatura na estabilidade da enzima lipase foi determinado por meio da incubação de 1 mL de solução de lipase (5 mg/mL) numa faixa de temperatura de 37-60°C em tampão fosfato (0,1 M) pH 8,0 durante 120 min. Em intervalos de 60 min, as amostras foram retiradas e imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. Em seguida, a atividade residual foi determinada a 37°C, pela adição de 5 mL de substrato preparado como descrito no item 3.2.2. As constantes de inativação térmica, foram calculadas pela equação 3.2.

$$\ln A = \ln A_o - K_d \cdot t \quad (3.2)$$

Em que: A_o = Atividade enzimática inicial (U/mg); A = Atividade residual medida após tratamento térmico (U/mg); K_d = Constante de inativação térmica (h^{-1}); t = Tempo de incubação da solução enzimática (h)

O tempo de meia-vida da enzima, definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, foi calculado pela equação 3.3.

$$t_{1/2} = \ln 0,5 / -K_d \quad (3.3)$$

Em que: $t_{1/2}$ = Tempo de meia-vida da enzima (h)

3.2.6. Influência de Íons Metálicos

Foi verificada a influência de íons metálicos monovalentes (Na^+ , NH_4^+ , K^+ e Ag^+), bivalentes (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{2+}) e trivalentes (Fe^{3+} , Al^{3+} , Bi^{3+}) sobre a atividade das lipases empregando-se a reação de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia descrita no item 3.2.2. Foi adicionado ao meio reacional 1 mL de uma solução 20 mM de cada íon, sem adição de tampão fosfato 0,1 M.

3.2.7. Influência da Concentração Inicial de Substrato

A influência do substrato e a ocorrência de algum tipo de inibição da enzima foram estudadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2, utilizando as enzimas LPP, LKM e LNU. A porcentagem do azeite de oliva, empregado como substrato, variou na faixa de 2,5% a 50%. Os ensaios foram conduzidos em pH 8,0 para todas as preparações de lipases.

3.3. Caracterização do Efluente e do Soro de Queijo

3.3.1. Determinação da Concentração de Lipídeos

A concentração de lipídeos no efluente foi determinada por extração em Soxhlet com hexano como solvente segundo procedimento padrão (APHA, 1995). Um determinado volume de amostra (50-300 mL) foi acidificado com HCl concentrado (5mL para cada litro de amostra) e filtrado em um disco de tecido sobre o qual se colocava um disco de papel de filtro Whatman nº 41 e uma camada de diatomita, obtida pela filtração de uma suspensão aquosa de terra diatomácea a 5% m/m. O papel de filtro e a torta de diatomita contendo os lipídeos retidos foram introduzidos em cartucho de extração previamente descontaminado pela extração com hexano por, no mínimo, 2 h, e todo o conjunto levado para secar em estufa a 105°C, por 30 min. Após resfriamento, o cartucho foi colocado no rotaevaporador e foi iniciada a extração com hexano a 20 rpm por 4 h. Em seguida, o solvente foi evaporado e o balão de destilação contendo o resíduo gorduroso foi seco em estufa a 105°C até peso constante e então novamente pesado. A diferença de massa obtida (balão vazio e balão mais lipídeos) foi dividida pelo volume amostrado, obtendo-se a concentração de óleos e graxas presentes na amostra. A concentração de lipídeos foi calculado pela equação 3.4.

$$\text{Lipídeos (mg/L)} = \frac{(M_2 - M_1)}{V_a} \quad (3.4)$$

Em que: M_1 = Massa do balão vazio (mg); M_2 = Massa do balão e resíduo gorduroso (mg); V_a = Volume da amostra filtrada (mL).

3.3.2. Teor de Sólidos Totais

O efluente bruto e o soro de queijo (50 mL) foram evaporados em rotoevaporador e o balão de destilação contendo o resíduo sólido foi seco em estufa a 105°C até peso constante e então novamente pesado. A diferença de massa obtida (balão vazio e balão mais sólidos) foi dividida pelo volume amostrado, obtendo-se a concentração de sólidos totais contidos na amostra. O teor de sólidos totais foi calculado pela equação 3.5.

$$\text{Sólidos Totais (g/L)} = \frac{(M_2 - M_1)}{V_a} \quad (3.5)$$

Em que: M_1 = Massa do balão vazio (g); M_2 = Massa do balão e resíduo gorduroso (g); V_a = Volume da amostra (L)

3.3.3. Índice de Acidez

O índice de acidez foi determinado conforme metodologia descrita por MORETTO e FETT (1998). Em um frasco Erlenmeyer de 125 mL, foram colocados 2 g de efluente e 25 mL de solução neutralizada de éter de petróleo e álcool etílico (2:1). Adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína e a amostra foi titulada com solução 0,1 N de NaOH. O índice de acidez (%) foi calculado de acordo com a equação 3.6.

$$IA (\%) = \frac{V \cdot F \cdot 10}{M} \cdot 100 \quad (3.6)$$

Em que: V = Volume de NaOH gastos na amostra (mL); F = Fator de correção da solução de NaOH 0,1N; M = Massa da amostra (g).

3.3.4. Índice de Saponificação

Índice de saponificação é definido como sendo o número de miligramas (mg) de KOH requerido para saponificar um grama de lipídeos. O índice de saponificação foi determinado conforme metodologia descrita por MORETTO e FETT (1998). Em um frasco Erlenmeyer foram adicionados 2 g do efluente e, com auxílio de uma bureta, 20 mL de solução alcoólica de KOH a 4% em massa. Adaptou-se o Erlenmeyer a um

condensador de refluxo e a amostra foi aquecida brandamente, por um período de 30 min. Resfriou-se e foram adicionados 3 gotas de fenolftaleína. Titulou-se com solução de HCl 0,5 N, até desaparecer a coloração rósea. Esse mesmo procedimento foi feito para o controle. A diferença entre os volumes de HCl gastos nas duas titulações é equivalente à quantidade de KOH gasto na saponificação. O índice de saponificação foi calculado de acordo com a equação 3.7.

$$IS = \frac{3.(Va - Vb). F. 56,11}{M} \quad (3.7)$$

Em que: Va = Volume gasto de HCl na titulação da amostra (mL); Vb = Volume gasto de HCl na titulação do controle (mL); F = Fator de correção da solução de HCl 0,5N; M = Massa da amostra (g).

3.3.5. Porcentagem de Ácidos Graxos Livres

A porcentagem de ácidos graxos livres foi determinada conforme metodologia descrita por MORETTO e FETT (1998). Em um Erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 8 g da amostra e 50 mL de álcool etílico a 95%, neutralizando com solução 0,1 N de NaOH e fenolftaleína, como indicador. O sistema foi aquecido até a ebulição e titulada, a quente, com a solução de NaOH, até coloração rósea por 15 segundos. A porcentagem de ácidos graxos livres em massa foi calculada pela equação 3.8.

$$AGL (\%) = \frac{(V_2 - V_1). N. 28,2}{M} . 100 \quad (3.8)$$

Em que: V_2 = Volume gasto de NaOH na 1ª titulação (mL); V_1 = Volume gasto de NaOH na 2ª titulação (mL); N = Concentração Normal da solução de NaOH; M = Massa da amostra (g)

3.3.6. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A Demanda Química de Oxigênio do efluente foi determinada de acordo com a metodologia descrita por APHA (1995). Foi utilizada solução 0,25 N de $K_2Cr_2O_7$ em meio ácido, contendo Ag_2SO_4 como catalisador e $HgSO_4$ para eliminar a interferência

de cloretos presentes na amostra. As amostras foram diluídas adequadamente, preparadas e digeridas a 150°C por 2 h. Resfriou-se os balões de fundo chato e em seguida, foram titulados com solução de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 N, utilizando o complexo ferroína como indicador, com mudança da cor laranja para verde e finalmente para vermelho intenso. Foram realizadas dosagens de DQO para o controle e amostras, utilizando as preparações enzimáticas. A Demanda Química de Oxigênio foi calculada pela equação 3.9.

$$DQO \text{ (mg/L)} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot N \cdot 8000 \cdot D}{V_a} \quad (3.9)$$

Em que: V_1 = Volume gasto de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na titulação do controle (mL); V_2 = Volume gasto de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na titulação da amostra (mL); N = Concentração normal da solução de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; D = Fator de diluição da amostra; V_a = Volume da amostra utilizada (mL).

3.3.7. Determinação de Cor

A cor do efluente foi determinada de acordo com a metodologia descrita por NAGARATHNAMMA *et al.* (1999). As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 25 min para a remoção dos sólidos em suspensão e o pH das amostras foram ajustados em 7.6 pela adição de NaOH 2M. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de cor a 465 nm. Os valores de absorvância obtidos foram transformados em Unidades de Cor (UC) pela equação 3.10.

$$UC = \frac{500 \cdot A_2}{A_1} \quad (3.10)$$

Em que: A_1 = Absorvância de 500 (UC) de uma solução padrão de platina-cobalto ($A_{465}=0,132$) (nm); A_2 = Absorvância das amostras (nm).

3.3.8. Determinação de Cor por Varredura

A determinação de cor por varredura foi realizada nas regiões do ultravioleta (400-250 nm) e do visível (750-400 nm) (VOGEL, 1981). As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 25 min para a remoção de sólidos em suspensão e o pH das amostras foram ajustados em 7.6 pela adição de NaOH 2M e o sobrenadante foi previamente diluído e utilizado para a determinação de cor por varredura no intervalo de 750-250 nm.

3.3.9. Concentração de Glicerol

A determinação da concentração de glicerol consiste na reação do glicerol contido na amostra com metaperiodato de sódio (NaIO_4) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico: este último utilizado para estimar a concentração de glicerol (COKS e VAN REDE, 1966). A amostra contendo entre 1 a 2 g de gordura foi previamente diluída em 50 mL de água destilada e acidificada com ácido sulfúrico 0,2 N, utilizando azul de bromotimol como indicador. A solução foi, então, neutralizada com NaOH 0,05 N até coloração azul. Em seguida, 100 mL de solução de metaperiodato de sódio (60 g/L) foram adicionados à amostra e a mistura foi mantida ao abrigo da luz por 30 min. Após este período, 10 mL de uma solução aquosa de etilenoglicol (1:1) foram adicionados à mistura que foi deixada à temperatura ambiente também ao abrigo da luz por mais 10 min. As amostras foram, então, diluídas para um volume de 300mL com água destilada e tituladas com solução de NaOH 0,125 N, usando pHmetro para determinar o ponto final. A percentagem de glicerol contida na amostra foi determinada pela equação 3.11.

$$\text{Glicerol } (\% m / m) = \frac{9,209 \cdot N \cdot (V_1 - V_2)}{M} \quad (3.11)$$

Em que: N = Normalidade da solução de NaOH; V_1 = Volume da solução de NaOH gasto para titular a amostra (mL); V_2 = Volume da solução de NaOH gasto para titular o controle (mL); M = Massa de amostra utilizada (g).

3.3.10. Concentração de Proteínas

O teor de proteína contidas nas amostras de soro de queijo e efluentes bruto e hidrolisado foi dosado pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), baseado na colorimetria de sais de cobre com substâncias contendo ligações peptídicas, em solução alcalina. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 0,1 mg/mL, como apresentado no Apêndice 8.1.B

3.3.11. Concentração de Açúcares Redutores

O teor de açúcares redutores foi dosado pelo método DNS (MARTELLI e PANEK, 1968), baseado na redução do ácido 3,5 dinitro salicílico. Glicose foi usada como padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 96 µg/mL, como apresentado no Apêndice 8.1.C.

3.4. Testes de Hidrólise Enzimática

3.4.1 Seleção da Preparação Enzimática para Hidrólise do Soro de Queijo

Para o soro de queijo foram testadas as lipases pancreáticas LPP e LKM. O método consistiu no monitoramento da reação de hidrólise, medindo-se a produção de ácidos graxos, em intervalos de tempo definidos, num período total de 24 h. Parâmetros reacionais, tais como pH e temperatura foram fixados, tomando por base os dados referentes à caracterização bioquímica dessas preparações enzimáticas. O substrato foi preparado pela adição direta do agente emulsificante ao soro de queijo. Em reatores de bancada de 125 mL foram adicionados emulsões preparadas com 100 g do substrato, goma arábica (3-7% m/m) e íons cálcio (0-0,01 M). O pH do meio reacional foi ajustado pela adição de solução de NaOH 1M ou NaHCO₃, para manter as condições operacionais mais próximas daquelas encontradas industrialmente. Todos os tratamentos foram efetuados empregando uma concentração fixa (3 mg/mL) para as ambas lipases (LPP e LKM), conforme mostrado na Tabela 3.1.

Os reatores foram incubados por um período máximo de 24 h numa temperatura de 40 e 45°C para as lipases LKM e LPP, respectivamente, em banho de silicone, com agitação magnética (200 rpm). Em intervalos de tempo de 60 min foram retiradas 2 g das amostras do meio reacional e o teor de ácido graxo quantificado por titulação com

KOH 0,02 N. O ensaio que proporcionou a maior formação de ácidos graxos, foram determinados os percentuais de hidrólise de lipídeos e proteínas e glicerol formado.

Tabela 3.1. Testes de hidrólise do soro de queijo empregando as preparações enzimáticas

LKM	LPP	[E] (%)	AE (%)	CaCl ₂ (mM)	Ajuste de pH
CA	CB	0	3	0	Ausente
1 A	1 B	0	7	0	Ausente
2 A	2 B	0,3	7	0	Presente ¹
3 A	3 B	0,3	3	0	Ausente
4 A	4 B	0,3	3	0	Presente ²
5 A	5 B	0,3	7	0	Ausente
6 A	6 B	0,3	7	0	Presente ²
7 A	7 B	0,3	3	0,01	Ausente
8 A	8 B	0,3	7	0,01	Presente ²

1- Ajuste de pH com NaHCO₃, 2- Ajuste de pH com solução NaOH 1M, [E]: Concentração de lipase, [AE]: Concentração de agente emulsificante (goma arábica), CA,CB: Reações sem adição de lipase (controle).

3.4.2. Seleção da Preparação Enzimática para Hidrólise do Efluente

Para o efluente foram testadas as lipases pancreáticas LKM e LNU e a seleção foi efetuada por meio de planejamento estatístico, verificando simultaneamente o efeito da concentração de íons sódio (NaCl), em substituição à goma arábica. O objetivo deste conjunto de testes foi determinar a melhor combinação das variáveis para a obtenção máxima de ácidos graxos livres (AGL). Um planejamento fatorial 2², com 5 pontos centrais, foi utilizado para melhor entendimento da influência individual dessas variáveis e de suas interações na hidrólise enzimática do efluente. Na Tabela 3.2 estão apresentados os níveis escolhidos para cada variável. O sinal (+) representa o nível máximo; o sinal (-) o nível mínimo e o sinal (0) o ponto central.

As reações de hidrólise foram realizadas em reatores de bancada de 125 mL contendo 100 g do efluente, concentração fixa de enzima (0,3% em massa) e NaCl. As misturas foram incubadas sob agitação constante de 200 rpm. A temperatura do sistema foi mantida constante em 37°C em banho de silicone e tempo de hidrólise de 6 h. A enzima foi adicionada ao meio e em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para acompanhamento da evolução da reação. Como variável resposta foi considerada a

concentração de ácidos graxos formados na hidrólise dos lipídeos do efluente. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Statgraphics versão 6.0.

Tabela 3.2. Níveis das variáveis utilizados nos ensaios de hidrólise do efluente

Variáveis	Níveis		
	Mínimo (-)	Ponto central (0)	Máximo (+)
Preparação comercial de lipase	LKM	-	LNU
Concentração de NaCl (mM)	0	3,5	7,0

LKM: Lipase Kin Master, LNU: Lipase Nuclear

3.4.3. Hidrólise do Efluente com a Lipase LNU

O monitoramento da reação de hidrólise de lipídeos contidos no efluente e os parâmetros reacionais, empregando a preparação enzimática LNU, foi adotado conforme metodologia descrita no item 3.4.1. Em reatores de bancada de 125 mL foram adicionados 100 g do efluente, variando as concentrações enzimáticas (3-5 mg/mL) e de íons cálcio (0-0,01 M). O pH do meio reacional foi ajustado pela adição de solução alcalinizante NaOH ou NaHCO₃ (1M), para manter as condições operacionais mais próximas daquelas encontradas industrialmente. Os reatores foram incubados por um período máximo de 24 h a 37°C, em banho de silicone, com agitação magnética (200 rpm). Em intervalos de tempo de 60 min foram retirados 2 g das amostras do meio reacional e o teor de ácido graxo quantificado por titulação com KOH 0,02 N. O ensaio que forneceu a maior formação de ácidos graxos, foram determinados os percentuais de hidrólise de lipídeos e proteínas e glicerol formado.

3.5. Hidrólise em Reatores de Bancada

As reações de hidrólise do efluente para posterior avaliação da biodegradabilidade anaeróbia foram realizadas em reatores de bancada providos de recipientes em aço inox (capacidade de 350 mL) com agitador mecânico (velocidade controlada de 200 rpm). O meio reacional foi preparado de acordo com o estabelecido no item 3.4.3 e a enzima LNU foi adicionada ao meio, contendo 250 g de efluente, nas condições previamente estabelecidas (seção 3.4.3). Em tempos pré-determinados de 4, 8, 12 e 24 h foram retiradas amostras para acompanhamento da evolução da reação (ácidos graxos formados). A atividade hidrolítica da lipase foi paralisada ao final dos

ensaios com aquecimento do meio reacional até 60°C por um período de 10 min. A temperatura do sistema foi mantida a 37°C por aquecimento em banho termostaticado com água. Foram determinados os valores de pH, ácidos graxos formados (mM), e as porcentagens de hidrólise de lipídeos e proteínas e glicerol formado. A porcentagem de hidrólise de lipídeos foi calculada de acordo com a equação 3.12.

$$\% H_{\text{glicerol}} = \left(\frac{C_f - C_i}{C_f} \right) \cdot 100 \quad (3.12)$$

Em que: Cf = Concentração final de glicerol; Ci = Concentração inicial de glicerol

3.6. Testes de Atividade Metanogênica e Biodegradabilidade Anaeróbia

A metodologia adotada foi proposta por PEREIRA (2004) para avaliação da atividade metanogênica específica e biodegradabilidade anaeróbia.

A biodegradabilidade anaeróbia do efluente industrial foi conduzida em frascos tipo soro vedados, acoplados a gasômetros (frascos de Duran) preenchidos com 300 mL de solução NaOH 5% (m/v) para coleta do metano produzido. O volume de solução alcalina deslocado do gasômetro foi recolhido em Erlenmeyers de 125 mL situados à jusante. Nos frascos tipo soro foram adicionados 50 mL de lodo anaeróbio e 250 mL de efluente bruto ou pré-tratado enzimaticamente por diferentes tempos de hidrólise (4 a 24 h) a 35°C. Dois controles foram utilizados: efluente bruto (C₁) e efluente bruto suplementado com enzima LNU (5 mg/mL), íons cálcio (0,01M) e ajuste de pH com solução alcalinizante NaOH 1M (C₂). Nesse último caso, as etapas de hidrólise e biodegradação foram efetuados simultaneamente. Por um período estabelecido (15 e 28 dias) foi medido, em intervalos de 24 h, o volume de metano formado na digestão anaeróbia. Ao final dos testes, as amostras foram centrifugadas (25 min e 4000 rpm) e submetidas as análises de concentração de proteína residual, açúcares redutores, DQO e cor, pH, volume de metano formado e ácidos presentes. A avaliação do perfil cinético de remoção da matéria orgânica (quantificada como DQO) permitiu avaliar o efeito do pré-tratamento enzimático do efluente, tendo o efluente bruto, como controle.

A biodegradabilidade é a porcentagem de DQO biodegradada calculada pela relação entre a DQO final e a DQO inicial. A DQO biodegradada (DQO-BD) é a diferença entre a DQO inicial e a final, conforme mostrada na equação 3.13.

$$DQO - BD = \left(\frac{C_{DQO.i} - C_{DQO.f}}{C_{DQO.i}} \right) \cdot 100 \quad (3.13)$$

Em que: DQO-BD = % de DQO biodegradada; $C_{DQO.i}$ = Concentração DQO no início do teste (mg/L); $C_{DQO.f}$ = Concentração DQO no final do teste (mg/L).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Propriedades Catalíticas das Preparações de Lipase

Foram utilizadas três preparações de enzimas pancreáticas comercializadas pelas empresas Sigma, Kin Master e Nuclear. Algumas características de interesse das enzimas testadas foram descritas na seção 2.5.1 (FABER, 1997; KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998; BOLETIM INFORMATIVO KIN MASTER, 2000).

A caracterização das preparações comerciais de lipase foi uma etapa preliminar necessária, tendo em vista que os valores de atividade fornecidos pelos fabricantes são determinados na maioria dos casos por métodos diversos. Desta forma, na Tabela 4.1 são apresentadas as atividades lipolíticas dessas preparações empregando a hidrólise do azeite de oliva como método de análise (pH 7,0 e 37°C), conforme procedimento descrito na seção 3.2.2. A Tabela 4.1, também inclui os teores de proteína e as atividades específicas dessas preparações. Nesta seção são ainda apresentados e discutidos os resultados obtidos quanto à influência do pH, íons metálicos e temperatura sobre a atividade das lipases pancreática (LPP) e pancreatina (LKM e LNU), bem como determinado as constantes de desativação térmica e parâmetros cinéticos (Apêndice 8.2).

Tabela 4.1. Propriedades catalíticas das preparações de lipases testadas

Lipase	Atividade ¹ (U/mg de amostra)	Proteína (mg/g de amostra)	Atividade específica ² (U/ mg proteína)
Pancreática (LPP)	3573 ± 306	130,8	27400
Pancreatina (LKM)	3357 ± 157	142,9	23500
Pancreatina (LNU)	1771 ± 32	127,3	13900

1- pH 7,0 e 37°C.

2- Valores médios de atividade específica

4.1.1. Influência do pH e Temperatura na Atividade das Preparações de Lipases

A maioria das enzimas apresentam um valor de pH ótimo, no qual sua atividade é máxima. Acima ou abaixo desse valor, a atividade é reduzida. A inter-relação da atividade enzimática com o pH, para qualquer enzima, depende do comportamento ácido-básico do meio, natureza do substrato, ponto isoelétrico, estado de pureza da

lipase e e força iônica.

Os resultados representados na Figura 4.1 mostram que as lipases pancreáticas apresentaram valores de pH ótimo em meios alcalinos. A LPP, LKM e LNU alcançaram atividades máximas de 5285 ± 383 U/mg, 4606 ± 238 U/mg e 3992 ± 2 U/mg, respectivamente, em pH igual a 8,0.

Para a determinação da temperatura ótima das preparações enzimáticas (LPP, LKM e LNU) variou-se a temperatura de incubação entre 30 e 60°C em pH 8,0, empregando a metodologia descrita por SOARES *et al.* (1999). As atividades hidrolíticas das lipases são mostradas na Figura 4.2. Observa-se que as lipases LPP, LKM e LNU apresentam temperaturas ótimas de 45, 40 e 37°C, respectivamente.

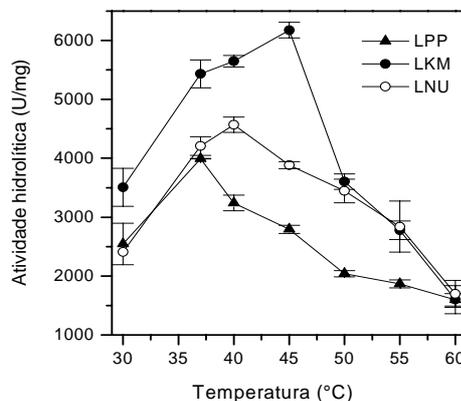
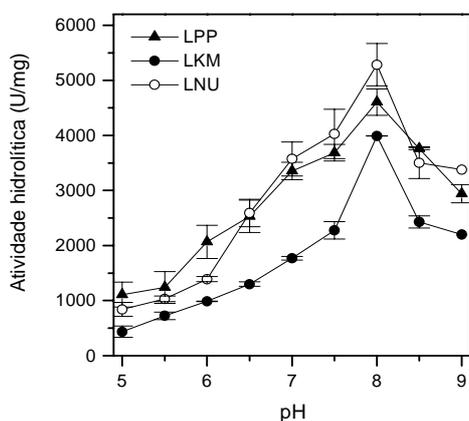


Figura 4.1. Influência do pH sobre a atividade hidrolítica das preparações de lipases LPP, LKM e LNU.

Figura 4.2. Influência da temperatura na atividade hidrolítica das preparações de lipase LPP, LKM e LNU.

4.1.2. Estabilidade Térmica das Preparações Enzimáticas

A exposição da enzima em temperaturas elevadas, por longos períodos de tempo, provoca efeitos de desdobramento da cadeia polipeptídica da enzima, ocorrendo possíveis mutações nestas regiões, levando a sua desnaturação (ZHU *et al.*, 2001). A estabilidade térmica da enzima diminuiu com o aumento da temperatura e tempo de exposição e também está relacionada com sua estrutura (ZHU *et al.*, 2001).

A Figura 4.3 apresenta a atividade residual das lipases LPP, LKM e LNU, após tratamento térmico, em banho termostaticado, incubadas por um período de 1 h.

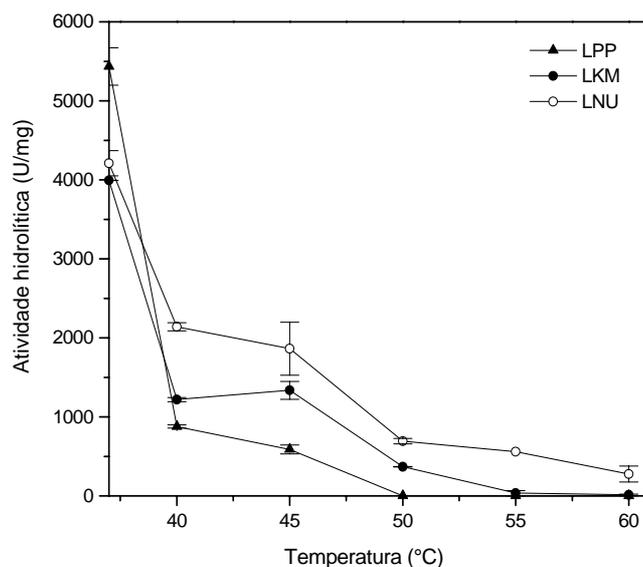


Figura 4.3. Atividade residual das preparações de LPP, LKM e LNU termicamente tratadas em diferentes temperaturas por 1 h. Ensaio realizado a 37°C, substrato azeite de oliva 50%.

Os resultados obtidos indicam que as preparações de lipases testadas são termicamente instáveis, devido à desnaturação da estrutura proteica que destrói os sítios ativos da enzima, impedindo a formação do complexo enzima-substrato que é responsável pela formação do glicerol e dos ácidos graxos, liberados na hidrólise.

A partir desses resultados, calculou-se a constante de inativação térmica (K_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) das lipases, conforme mostrado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Constante de inativação térmica e tempo de meia-vida das preparações LPP, LKM e LNU (tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0), após 1 h de incubação

Temperatura (°C)	Constante de inativação (K_d) (h^{-1})			Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) (h)		
	LPP	LKM	LNU	LPP	LKM	LNU
40	1,84 ± 0,1	0,67 ± 0	1,18 ± 0	0,38 ± 0	1,03 ± 0	0,58 ± 0
45	2,23 ± 0,1	0,83 ± 0,2	1,10 ± 0	0,31 ± 0	0,90 ± 0,2	0,63 ± 0
50	cd	1,81 ± 0,1	2,38 ± 0	0	0,39 ± 0	0,29 ± 0
55	cd	2,02 ± 0	4,07 ± 0	0	0,34 ± 0	0,17 ± 0
60	cd	2,79 ± 0,4	5,16 ± 0	0	0,25 ± 0	0,13 ± 0

cd – completamente desnaturada.

4.1.4. Influência de Íons Metálicos na Atividade Hidrolítica das Lipases

A influência de íons metálicos sobre a atividade lipolítica das lipases LPP, LKM e LNU na hidrólise do azeite de oliva, é mostrada na Figura 4.4.

Observa-se que os íons cálcio e sódio incrementaram a atividade hidrolítica de todas as preparações de lipase testadas. O íon cálcio aumentou a atividade das lipases LPP, LKM e LNU em 5,6, 28,1 e 20,4%, respectivamente, se comparado com o controle (C), sem a adição de íons. O efeito desse íon foi mais significativo para as lipases LKM e LNU, o que não foi constatado para a lipase LPP, com discreto incremento na atividade hidrolítica.

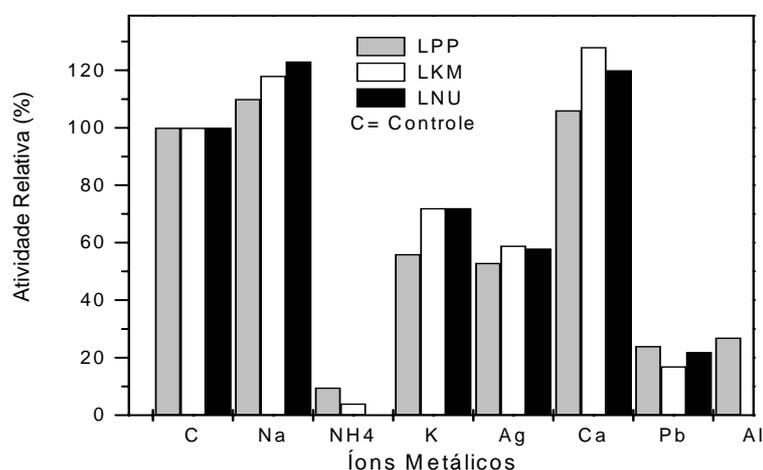


Figura 4.4. Influência dos íons metálicos sobre a atividade hidrolítica das preparações de lipases LPP, LKM e LNU, na concentração de 20 mM.

Os íons sódio incrementaram as atividades hidrolíticas em 10,4, 18,5 e 22,6% para as lipases LPP, LKM e LNU, respectivamente. Dentre as lipases estudadas, a LNU foi a mais dependente dos íons cálcio e sódio, com aumento na atividade hidrolítica superior a 20% e a lipase LPP apresentou menor influência dos íons cálcio e sódio.

O aumento da valência dos íons utilizados (1+ para 3+) resultou em um maior grau de inibição sobre a atividade hidrolítica das lipases. Dentre os íons monovalentes, o de maior grau de inibição foi constatado para o íon amônio (NH_4^+) que reduziu em 90% da atividade da enzima em relação ao controle. Os íons divalentes, exceto o cálcio, também reduziram, consideravelmente, a atividade das lipases.

Estudos descritos na literatura mostram que os íons Fe^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} são potenciais inibidores da atividade hidrolítica das lipases (CHARTRAIN *et al.*, 1993; LIN *et al.*, 1996; SHARON *et al.*, 1998). O maior grau de inibição sobre as lipases foi observado com a suplementação de íons trivalentes. Este comportamento pode ser atribuído às ligações estáveis entre estes íons com o sítio ativo das lipases. Nos testes de hidrólise do azeite de oliva, foi observada a formação de precipitados para ambos os íons, principalmente Bi^{3+} e Fe^{3+} . O elevado grau de inibição observado para os íons Cu^{2+} e Fe^{3+} se deve ao fato de que estes íons são agentes oxidantes. Estes compostos auxiliam na oxidação do sítio catalítico das enzimas, o que impede a sua atuação sobre o substrato. Enzimas oxidativas, como lacases, possuem estes íons em seus sítios ativos (AGUIAR e FERRAZ, 2002). Na hidrólise de trioleína por lipase pancreática de peru, realizada por SAYARI *et al.* (2000), foi observada a influência significativa da suplementação de íons Na^+ e Ca^{2+} sobre a atividade das preparações de lipases.

Os íons cálcio e sódio também influenciaram a atividade hidrolítica de enzimas contaminantes presentes nas preparações enzimáticas, como proteases e α -amilases (AGUILLAR *et al.*, 2000; GHORBEL *et al.*, 2003). GHORBEL *et al.* (2003), estudaram a influência de íons cálcio e outros íons sobre a estabilidade térmica de protease microbiana de *Bacillus cereus* BG1. Concluíram que íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , na concentração de 5 mM, aumentaram a atividade proteásica e os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} reduziram sensivelmente a atividade hidrolítica da enzima, se comparada com o controle, sem a adição de íons. A aplicação de íons Ca^{2+} , na concentração de 2mM, também aumentou a temperatura ótima de 50 para 60°C. Estudos realizados por AGUILLAR *et al.* (2000), mostram a influência de íons metálicos sobre a hidrólise de amido por α -amilase da espécie bacteriana *Lactobacillus manihotivorans* LMG18010^T. Os resultados mostram que os íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} aumentaram a atividade enzimática, mas a suplementação do meio reacional com íons Al^{3+} , Fe^{3+} e Hg^{2+} reduziu sensivelmente a atividade de hidrólise. Dados sobre a atuação de íons cálcio na atividade hidrolítica de proteases e amilases de enzimas pancreáticas de fonte suína são pouco relatados na literatura.

4.1.5. Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica das lipases LCR, LPP, LKM e a LNU, a porcentagem do azeite de oliva na emulsão foi variada na faixa de 10% a 50% (v/v). Os ensaios foram conduzidos no valor de pH ótimo (pH= 8,0) para cada preparação de lipase e na temperatura de 37°C, conforme descrito na seção 3.2.2.

Por meio desses ensaios, foi possível deduzir um mecanismo cinético da reação, isto é, a ordem na qual os substratos se ligam e os produtos são liberados da enzima e se esta ordem é obrigatória. Na Figura 4.5 são apresentadas as atividades enzimáticas em função da concentração do substrato preparado nas proporções apresentadas no Apêndice 8.2.

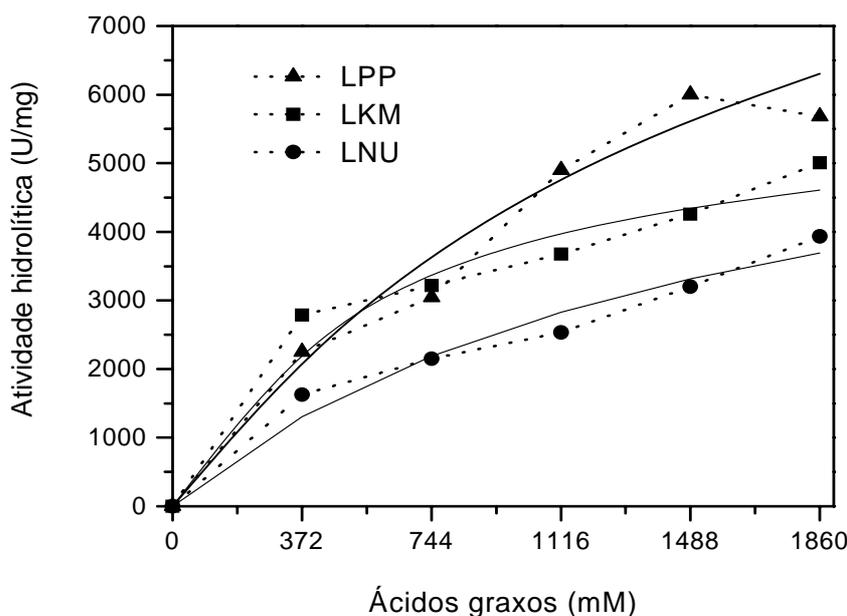


Figura 4.5. Atividade hidrolítica (valores experimentais: linha pontilhada e valores calculados: linha cheia) das lipases LPP, LKM e LNU em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo/ água (37°C).

Os resultados mostrados na Figura 4.5 sugerem que as atividades das preparações de lipases (LPP, LKM e LNU) em função da concentração de ácidos graxos seguem uma cinética do tipo Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada, e no tempo de reação hidrolítica (5 min), não se detectou uma possível

inibição pelos produtos da reação enzimática (ácidos graxos e glicerol) ou pelo decréscimo da concentração de água no meio reacional.

Utilizando o Programa Enzfitter foram calculadas as constantes de afinidade (K_m) e as velocidades máximas de reação (V_{max}). O ajuste das curvas experimentais pelo modelo proposto levou aos seguintes resultados apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos para as preparações de lipases LPP, LKM e LNU

Lipases	K_m (mM)	V_{max} (U/mg)
Pâncreas de porco (Sigma) - LPP	714	8310
Pancreatina (Kin Master) - LKM	532	5985
Pancreatina (Nuclear) - LNU	1150	5864

(Equações ajustadas pelo Programa Enzfitter)

Os valores de K_m determinados mostram que a lipase LKM é a preparação enzimática que apresenta maior afinidade pelo substrato (emulsão de azeite de oliva). A lipase LPP foi a preparação que demonstrou menor afinidade pelo substrato.

As principais características das lipases descritas nas seções anteriores são sumarizadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas das preparações das lipases (LPP, LKM e LNU)

Propriedades Catalíticas	Preparações de Lipases		
	LPP	LKM	LNU
pH ótimo	8,0	8,0	8,0
Temperatura ótima (°C)	45	40	37
K_d (40°C)	1,84	0,67	1,18
Tempo de meia-vida 40°C (h)	0,38	1,03	0,58
K_m (mM)	714	532	1150
V_{max} (U/mg)	8310	5985	5864

4.2. Caracterização do Efluente e Soro de Queijo

A caracterização do soro de queijo e efluente foi realizada de acordo com técnicas descritas no item 3.3, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Caracterização do efluente e do soro de queijo

Características	Soro de queijo	Efluente
Sólidos Totais (mg/L)	17530	6510-9164
Índice de Acidez	1,33	0,26-1,24
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	180,42	155,1-191,7
Ácidos Graxos Livres (%)	0,63	0,05-0,69
Lipídeos (mg/L)	3800	1530-4680
pH	6,41	4,76-6,04
DQO (mg/L)	94000	21350-52500
Proteínas (mg/L)	9590	3503-5711
Açúcares Redutores (mg/L)	4125	464-558
Glicerol (%)	2,74	0,31-0,43
Massa Específica (g/cm ³)	1,023	0,99-1,01
Unidades de Cor (UC)	-	13520-14034
Temperatura (°C)	-	25-32
Vazão de descarte do efluente (m ³ /dia)	-	100-120

As indústrias de derivados lácteos utilizam uma grande quantidade de água no processo industrial, gerando águas residuárias, caracterizadas por elevada carga orgânica e concentração de sólidos em suspensão, provenientes do processo de beneficiamento do leite e na lavagem de pisos e equipamentos como tanques e utensílios. Entretanto, as características dos efluentes líquidos variam, dependendo principalmente do tipo do processo adotado industrialmente.

Devido à dificuldade de obtenção do efluente no início de desenvolvimento deste trabalho, optou-se por adotar o soro de queijo como efluente representativo da indústria de derivados lácteos. O soro de queijo foi obtido no beneficiamento artesanal de queijo tipo Minas preparado no Laboratório de Biocatálise, com uma geração de 7,5 litros de soro para 10 litros de leite beneficiado.

O soro de queijo, comparado ao efluente, contém um elevado teor de matéria orgânica, caracterizada pela alta concentração de lipídeos, proteínas e açúcares. Esse importante subproduto do beneficiamento do leite tem sido utilizado na composição de derivados como iogurtes, sorvetes, leite longa-vida e alimentação animal (TEIXEIRA, 2001). O aproveitamento de compostos contidos no soro reduz, consideravelmente, a concentração de matéria orgânica nas estações de tratamento das águas residuárias.

Os valores encontrados para os índices de saponificação do soro de queijo (IS =

180,42 mg KOH/g) e efluente (IS = 172,42 ± 18,28 mg KOH/g) foram similares aos valores encontrados em óleos vegetais e em lipídeos de fonte animal (IS = 176-187 mg KOH/g) (GROSS, 1996). As concentrações de proteínas, açúcares e matéria orgânica, em termos de DQO, presentes no efluente em estudo são inferiores aos dados relatados na literatura (LYBERATOS *et al.*, 1997) e a concentração de lipídeos (1530-4680 mg/L) é 2,5 a 8 vezes superior (600 mg/L).

4.2.1. Composição de Ácidos Graxos do Soro de Queijo e Efluente

A composição de ácidos graxos contidos na gordura do leite, soro de queijo e efluente é mostrada na Tabela 4.6.

Os principais ácidos graxos presentes nos efluentes são o palmítico, em maior concentração (> 30%), seguido do oleico (>20%), esteárico (>10%) e mirístico (>10%). Na gordura do leite, esses ácidos graxos estão presentes na mesma proporção, mas em menor concentração. Esse fato se deve à maior concentração de ácidos graxos de baixa massa molar, como ácido butírico, caprótico e cáprico.

Tabela 4.6. Composição de ácidos graxos contidos na gordura do leite, soro de queijo e efluente

Ácidos Graxos	Concentração (%)		
	Soro de Queijo	Efluente	Gordura de leite ¹
Butírico (C _{4:0})	-	-	8,5
Caprótico (C _{6:0})	-	-	4,0
Caprílico (C _{8:0})	1,17	-	1,8
Cáprico (C _{10:0})	2,85	2,40	3,0
Láurico (C _{12:0})	3,63	3,21	3,6
Mirístico (C _{14:0})	12,4	13,9	10,5
Palmítico (C _{16:0})	32,5	39,2	23,5
Esteárico (C _{18:0})	12,8	16,8	10,0
Oleico (C _{18:1})	31,6	21,2	21,0
Linoleico (C _{18:2})	1,52	-	1,8
Linolênico (C _{18:3})	-	-	0,8

A análise dos ácidos graxos foi gentilmente efetuada na empresa COGNIS Brasil LTDA (Jacareí/SP).

¹ Fonte: PETRUY e LETTINGA, 1997

No soro de queijo, a concentração de ácidos graxos de baixa massa molar é

reduzida, pois estes ácidos são utilizados como aromatizantes de queijos e derivados (VIRTO *et al.*, 2003). A gordura do leite também contém ácidos linoleico e linolênico, com uma concentração de aproximadamente 2%, o que não é encontrado no efluente e no soro de queijo. No efluente, a concentração de ácidos graxos de cadeia longa é maior devido, provavelmente, a utilização de detergentes nas etapas de lavagem de pisos, tubulações e latões. Estes compostos são constituídos de sais de sódio de ácidos graxos de cadeia longa provenientes de lipídeos de fontes vegetal e animal.

4.3. Testes de Hidrólise do Soro de Queijo com as Preparações Enzimáticas LPP e LKM

Tomando por base a caracterização das preparações enzimáticas e do soro de queijo, foram inicialmente realizados testes com o objetivo de verificar o desempenho das preparações de lipases LPP e LKM na hidrólise dos triglicerídeos contidos no soro de queijo, possibilitando uma comparação do desempenho das enzimas entre si para a seleção de apenas um preparado, para estudos posteriores mais criteriosos.

A influência das diferentes condições testadas na hidrólise dos triglicerídeos presentes no soro de queijo expressa em termos de ácidos graxos liberados (mM) em função do tempo, são apresentadas nas Figuras 4.6 e 4.7, tomando por base os dados detalhados no Apêndice 8.3.A,B.

A liberação de ácidos graxos livres foi influenciada apenas pelo pH do meio, incluindo não só o valor de pH como também a solução alcalinizante (NaOH ou NaHCO₃) utilizada para o ajuste requerido.

Não houve produção de ácidos graxos nos ensaios efetuados sem adição de enzimas (controle, ensaios CA, CB) como também nos testes realizados com soro de queijo em pH previamente ajustado com a solução de NaHCO₃ (na ausência ou presença de enzimas, ensaios 1 A, B e 2 A, B). O desempenho insatisfatório observado nesses ensaios, pode ser atribuído a uma rápida elevação do pH do meio reacional a valores superiores a 9,0, afastando, desta forma, do pH ótimo de atuação das preparações enzimáticas (pH= 8,0) com conseqüente redução da atividade das lipases. Esse fato não foi observado por PEREIRA *et al.* (2003) nos testes de hidrólise enzimática de efluentes de indústrias avícolas ou em meios reacionais contendo apenas azeite de oliva emulsificado (dados não mostrados).

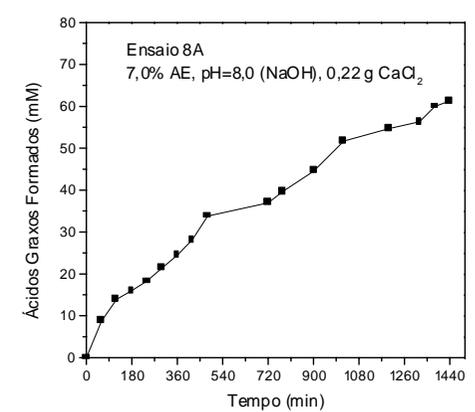
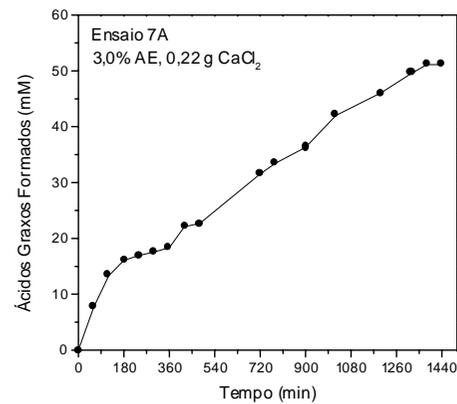
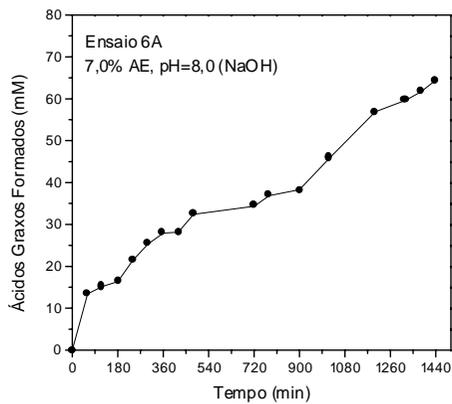
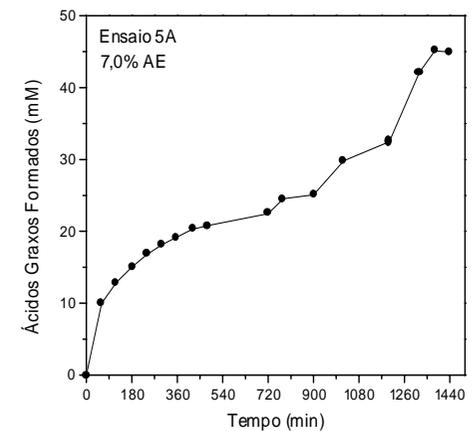
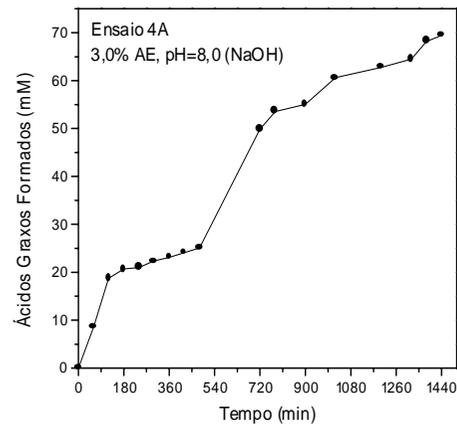
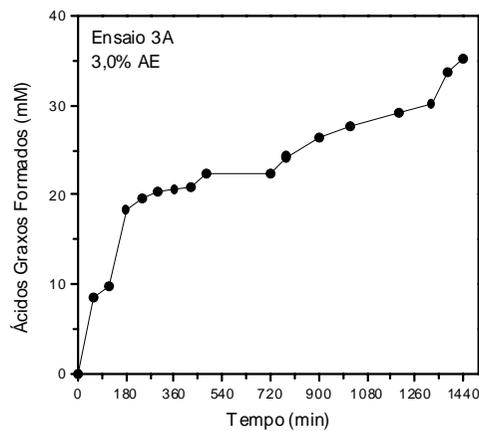


Figura 4.6. Hidrólise do teor de lipídeos do soro de queijo, empregando a preparação de lipase pancreatina (LKM) com concentração enzimática (3mg/mL), temperatura (40°C), agitação mecânica (200 rpm) e tempo (24 h).

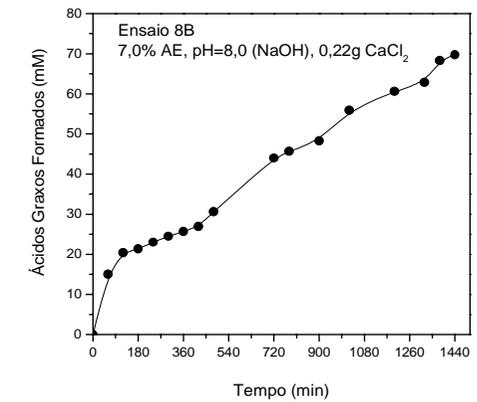
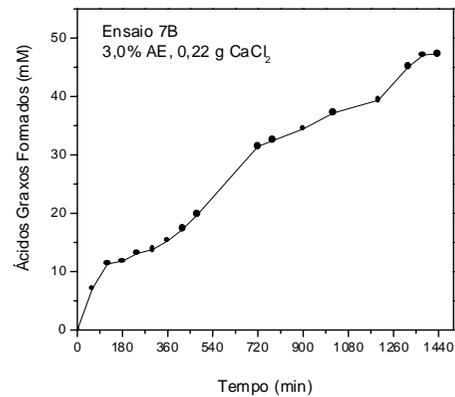
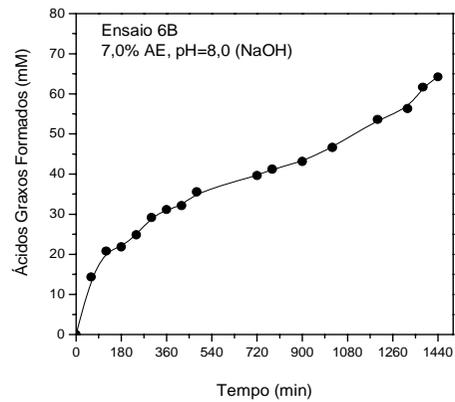
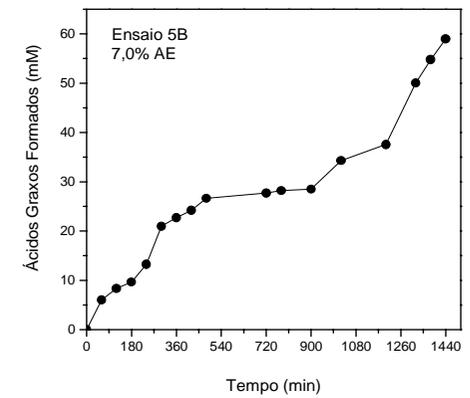
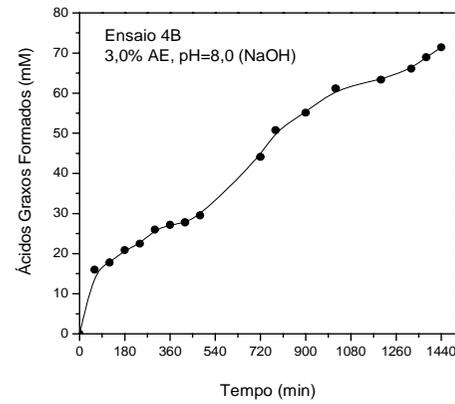
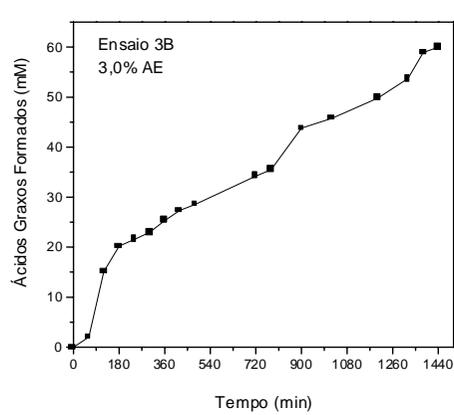


Figura 4.7. Hidrólise do teor de lipídeos do soro de queijo, empregando a preparação de lipase pancreática (LPP) com concentração enzimática (3mg/mL), temperatura (40°C), agitação mecânica (200 rpm) e tempo (24 h).

A influência do perfil de hidrólise obtido com soro de queijo sugere que algum tipo de composto, presente nesse substrato ou na própria preparação enzimática, possa ter reagido com o NaHCO_3 , influenciando negativamente a atividade lipolítica da lipase. Estudos adicionais são necessários para esclarecer esse mecanismo.

A utilização da solução de NaOH para o ajuste do pH do meio reacional foi testada (ensaios 4 A, B) e os resultados foram comparados com aqueles obtidos nos testes efetuados no pH original do soro de queijo (ensaios 3 A, B) (Figuras 4.6 e 4.7).

Verifica-se que o perfil de formação de ácidos graxos em função do tempo para uma mesma concentração do agente emulsificante ($\text{AE}=3,0\%$) foi significativamente superior nos testes realizados com ajuste do pH do meio reacional (4 A, B). Como não foi detectado um comportamento similar ao conferido pelo NaHCO_3 , o ajuste do pH ótimo das preparações enzimáticas ($\text{pH}=8,0$), maximizou a ação catalítica das lipases, favorecendo a formação de elevadas concentrações de ácidos graxos da ordem de 92,94 e 91,86 mM para as lipases LKM e LPP, respectivamente. Para os ensaios realizados sem ajuste de pH (ensaios 3 A, B), a concentração máxima de ácidos graxos foi de 35,22 e 59,96 mM para as lipases LKM e LPP, respectivamente.

Comportamento similar foi observado em todos os outros testes efetuados com soro de queijo no pH original (ensaios 5A,B e 7A,B). Verifica-se, portanto, que independente das outras variáveis testadas, o ajuste do pH do meio reacional com NaOH foi um fator extremamente importante na hidrólise de lipídeos empregando ambas preparações de lipases.

A influência da concentração do agente emulsificante (AE) na formação de ácidos graxos foi também analisada para meios reacionais com ou sem ajuste do pH (ensaios 5 A,B; 6 A,B), conforme apresentado nas Figuras 4.6 e 4.7. Para a lipase LPP, o aumento da concentração do agente emulsificante de 3% (ensaios 3B e 4B) para 7% (ensaio 5B, 6B) não foi relevante, sendo constatada concentrações de ácidos graxos similares em ambas condições. Quando foi utilizada a preparação de lipase LKM foi verificado um pequeno aumento na concentração de ácidos graxos em 9,74 mM no meio emulsificado com 7% m/m de agente emulsificante (ensaios 3A, 5A). O aumento da concentração de agente emulsificante de 3% m/m (ensaios 4 A,B) para 7% m/m (ensaios 6A,B), não correspondeu a aumentos significativos de porcentagem de hidrólise.

Agentes emulsificantes têm sido sistematicamente empregados em dosagens de

atividade lipolítica quando se utiliza triacilgliceróis de cadeia longa como substratos. Considera-se, geralmente, que os agentes emulsificantes, especialmente a goma arábica, não interferem nos ensaios de hidrólise enzimática de lipídeos. TISS *et al.* (2002) observaram o efeito de inibição da goma arábica sobre a hidrólise de ésteres trioctanóicos, com a utilização de lipases de fontes microbiana e animal. Esses autores sugeriram que outros compostos tensoativos presentes nas formulações de goma arábica e a própria goma podem ser responsáveis pelo efeito de inibição de lipases. Essa inibição pode ser associada ao efeito de dessorção da lipase na interface água/óleo, pois a goma arábica consiste, principalmente, de cadeia de polissacarídeos, incluindo unidades de ácido glicurônico (WHISTLER, 1993). Na sua forma ionizada, os grupos carboxil do ácido glicurônico estão desprotonados e, conseqüentemente, conferem à interface da emulsão uma carga global negativa. A repulsão eletrostática de lipases de pâncreas na interface por cargas negativas dos sais de biliar, presentes nessas preparações, é um outro mecanismo de inibição de lipases (BORGSTRÖM, 1975). Além disso, a goma arábica contém, em sua composição, açúcares (D-galactose, L-arabinose, ácido D-glicurônico) e 2% de proteínas (prolina, hidroxiprolina e serina) (TISS *et al.*, 2002).

Finalmente foi verificada a influência dos íons cálcio em meios reacionais emulsificados com 7% de goma arábica e ajuste de pH (ensaios 6A,B e 8A,B). A adição do íon cálcio foi pouco relevante na hidrólise de lipídeos para a lipase LPP, sendo verificado um pequeno aumento na formação de ácidos graxos, da ordem de 5,55 mM. Para a preparação de lipase LKM a adição de íons cálcio promoveu um decréscimo de 3,11 mM de ácidos graxos. Esses resultados indicam que a presença desses íons foi pouco significativa na hidrólise de lipídeos, provavelmente devido à presença de íons cálcio no meio reacional, tornando desnecessária a sua suplementação. Algumas fontes prováveis de íons cálcio incluem: o próprio efluente (efluentes de indústrias de derivados lácteos são ricos em íons cálcio) e goma arábica, cuja formulação contém diversos íons, tais como cálcio, magnésio e potássio (TISS *et al.*, 2002).

As Figuras 4.8 e 4.9 demonstram o desempenho da hidrólise do efluente por meio das lipases LKM e LPP após 24 h de tratamento. Para ambas preparações a maior porcentagem de hidrólise de lipídeos presentes no soro de queijo foram obtidas nas seguintes condições experimentais: 3% m/m de agente emulsificante, ajuste do pH com solução de NaOH e ausência de íons cálcio (ensaios 4 A,B).

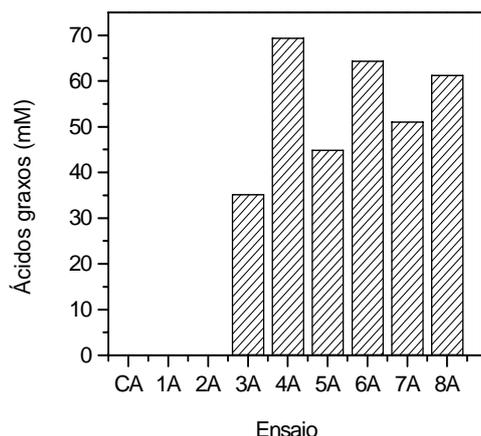


Figura 4.8. Concentração de ácidos graxos formados pela hidrólise do soro de queijo empregando a lipase LKM.

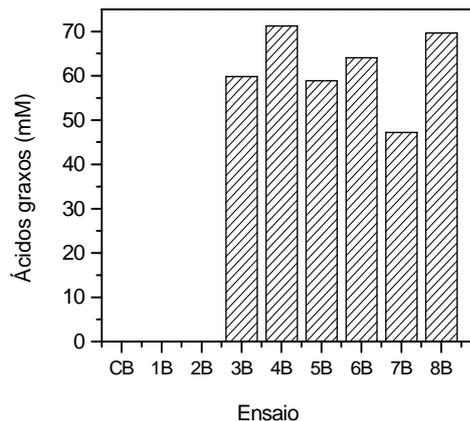


Figura 4.9. Concentração de ácidos graxos formados pela hidrólise do soro de queijo empregando a lipase LPP.

Complementando esta série de testes, as amostras tratadas enzimaticamente nas condições previamente estabelecidas (ensaios 4 A, B), foram analisadas quanto às porcentagens de hidrólise de lipídeos e proteínas e glicerol formado, cujos resultados encontram-se na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Composição do soro de queijo tratado enzimaticamente

Lipases	Glicerol formado (%)	Ácidos graxos formados (mM)	Porcentagem de hidrólise (%)	
			Lipídeos	Proteínas
LKM	29,6	71,4	23,1	77,5
LPP	30,1	69,4	22,8	69,9

Verifica-se na Tabela 4.7, que a concentração de glicerol formado pela lipase LPP foi similar à obtida pela lipase LKM, o que está de acordo com as concentrações de ácidos graxos formados pela utilização dessas preparações. Por meio da concentração de glicerol formado foi possível determinar a porcentagem de hidrólise máxima para o soro de queijo, pela equação 3.12. A eficiência de hidrólise empregando as lipases LPP e LKM foram, respectivamente, 23,1% e 22,8 %.

Com relação ao teor de proteínas, a lipase LKM, adquirida no mercado nacional forneceu maior redução, comparada com a lipase LPP, de procedência internacional, devido provavelmente à presença de proteases que também foram importantes na degradação de proteínas (BOLETIM INFORMATIVO KIN MASTER, 2000).

A enzima de fabricação nacional apresenta um limitado grau de pureza, o que diminui o seu custo e não interfere no processo. Além disso, a presença de outras enzimas contaminantes (proteases, amilases) é benéfica ao processo, tendo em vista que os efluentes das indústrias de derivados lácteos contêm, além de lipídeos, altos teores de proteínas provenientes do leite (caseína) e carboidratos como amido, utilizado na preparação de doces à base de leite e iogurtes. Tomando por base esses resultados, a LPP foi descartada dos testes subseqüentes.

4.4. Testes de Hidrólise do Efluente

4.4.1 Testes Preliminares de Seleção da Preparação de Lipase

Para a realização desses ensaios, foram utilizadas as preparações de lipases pancreáticas LKM (Kin Master) e LNU (Nuclear) e adotadas condições de hidrólise estabelecidas anteriormente para o soro de queijo, tais como: 3% em massa de agente emulsificante, ajuste de pH com solução de NaOH 1M, ausência de íons cálcio, temperatura 37 e 40°C para as lipases LNU e LKM respectivamente, agitação magnética a 200 rpm e tempo de hidrólise de 24 h.

As Figuras 4.10 e 4.11 mostram que a velocidade de formação de ácidos graxos foi elevada nas primeiras 6 h de reação para as hidrólises efetuadas tanto com a lipase LKM ($2,60 \pm 0,23$ mM/h) como para a lipase LNU ($2,76 \pm 0,04$ mM/h). Após este período, a velocidade de formação de ácidos graxos foi reduzida apenas para a lipase LKM, alcançando após 24 h concentrações de ácidos graxos livres da ordem de $18,02 \pm 0,52$ e $38,27 \pm 0,94$ mM, para as lipases LKM e LNU, respectivamente (Apêndice 8.4.A).

Nota-se que a concentração de ácidos graxos formados na hidrólise de lipídeos contidos nas águas residuárias, com concentração de 1530 mg/L, pela lipase LNU foi 2 vezes maior que a lipase LKM. Informações complementares foram obtidas por meio da determinação do ácidos graxos formados, porcentagens de hidrólise de lipídeos e proteínas e glicerol formado, conforme apresentados na Tabela 4.8.

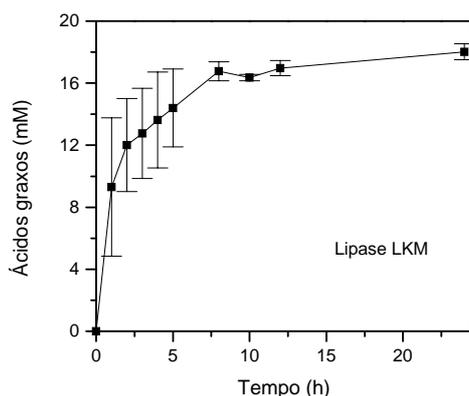


Figura 4.10. Hidrólise de lipídeos do efluente por LKM na presença de 3% m/m de goma arábica, 0,3% de lipase, ajuste de pH=8,0 com NaOH 1M a 40 °C e 200 rpm.

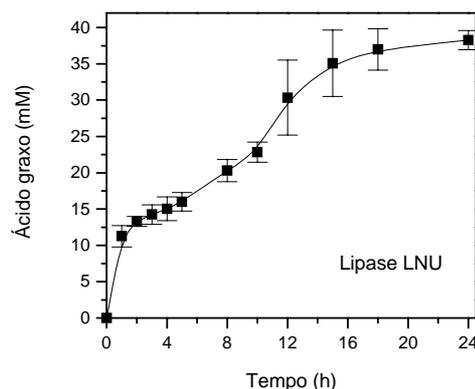


Figura 4.11. Hidrólise de lipídeos do efluente por LNU na presença de 3% m/m de goma arábica, 0,3% de lipase, ajuste de pH=8,0 com NaOH 1M a 40 °C e 200 rpm.

Tabela 4.8. Composição do efluente tratado enzimaticamente, empregando as lipases LKM e LNU

Preparação Enzimática	Glicerol formado (%)	Ácidos graxos formados (mM)	Porcentagem de hidrólise (%)	
			Lipídeos	Proteínas
LKM	24,0 ± 1,0	18,0 ± 0,5	30,5 ± 2,5	17,4 ± 0
LNU	30,0 ± 8,0	38,3 ± 0,9	38,9 ± 1,5	22,0 ± 10,0

Comparando a porcentagem de hidrólise obtida no soro de queijo para a lipase LKM (23,1%), verifica-se que foram obtidas porcentagens de hidrólise mais elevadas para o efluente tratado com as lipases LKM (30,5 ± 2,5%) e LNU (38,9 ± 1,5%), em relação ao soro de queijo, provavelmente, devido à maior concentração de glicerol presente inicialmente no soro de queijo (2,74%). A concentração de glicerol desloca o equilíbrio da reação para o sentido inverso, para a regeneração dos ésteres. ROONEY e WEATHERLEY (2001) avaliaram a influência do glicerol na reação de hidrólise do óleo de girassol empregando lipase de *Candida rugosa*, em bateladas consecutivas na proporção 3:2 de água e óleo. A remoção por centrifugação da fase aquosa, rica em glicerol, promoveu o aumento da eficiência de hidrólise, próximo a 100%, comparado com a hidrólise sem a remoção do glicerol, obtendo uma eficiência de hidrólise próximo a 85%. Entretanto, no pré-tratamento de efluentes ricos em lipídeos, esta etapa não é necessária, pois não é requerido elevada eficiência de hidrólise. Além disso, o glicerol

não inibe a atividade microbiana. PERLE *et al.* (1995) avaliaram o efeito dos produtos de hidrólise da gordura de leite, ácidos graxos de cadeia longa e glicerol, na produção de ATP e atividade metanogênica, utilizando ácido oleico como ácido graxo padrão e lodo anaeróbio não aclimatado. Esses autores concluíram que o glicerol não inibiu a atividade microbiana do lodo anaeróbio e promoveu o aumento da concentração de ATP e de biogás (CH₄), quando comparado com o ácido oleico.

A concentração de compostos proteicos no efluente também foi reduzida com o tratamento enzimático com porcentagem na remoção de proteínas de $17,4 \pm 0$ e $22,0 \pm 10,0\%$, para as lipases LKM e LNU, respectivamente. Os principais compostos gerados pela hidrólise de proteínas são peptídeos e aminoácidos (VIDAL *et al.*, 2000). Esses compostos, gerados pela hidrólise, possuem menor massa molar, o que pode auxiliar na biodegradabilidade anaeróbia desses efluentes.

4.4.2 Otimização por Planejamento Fatorial

A importância das variáveis em um processo pode ser determinada por meio de métodos estatísticos, os quais possibilitam o planejamento e a execução de forma organizada e racional de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Estes métodos permitem a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão, a modelagem empírica dos resultados e conseqüentemente a definição das faixas ótimas de operação do processo, respeitando restrições quando houver.

O método de planejamento experimental e análise de superfície de resposta tem com base o planejamento fatorial. Consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (como formação de ácidos graxos pela hidrólise de lipídeos contidos no efluente) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (preparação enzimática e concentração de NaCl). Estas técnicas são usadas para resolver as seguintes questões: como uma resposta é afetada sobre uma região de interesse por um dado conjunto de variáveis de entrada; quais os volumes de variáveis de entrada que resultarão num produto dentro das especificações desejadas; quais os valores de entrada que levarão ao melhor valor para uma resposta específica e como é a superfície próxima a este ponto.

Nessa etapa de desenvolvimento do presente trabalho, foram realizados ensaios

referentes ao planejamento e otimização de parâmetros das hidrólises de lipídeos presentes no efluente catalisadas pelas preparações enzimáticas LKM e LNU.

Na Tabela 4.9 encontram-se os resultados obtidos nos ensaios realizados com base no planejamento experimental 2², com 5 pontos centrais, para a avaliação da influência da concentração de NaCl (x_1), em substituição à goma arábica e do tipo de preparação enzimática (x_2). Foram mantidas fixas as condições: concentração enzimática de 3 mg/mL, ajuste de pH=8,0 com solução de NaOH 1M e temperatura de 37 e 40°C, para as lipases LNU e LKM, respectivamente, valores de temperatura baseados na estabilidade térmica dessas preparações enzimáticas. O perfil de formação de ácidos graxos é detalhado no Apêndice 8.4.B.

Tabela 4.9. Matriz do planejamento experimental na hidrólise de lipídeos contidos no efluente por um período de 6 h.

Ensaio	Variáveis reais		Variáveis cofificadas		Ácidos graxos formados (mM)
	NaCl (mM)	Lipase			
1	0	LKM	-1	-1	15,63
2	7	LKM	+1	-1	17,15
3	0	LNU	-1	+1	15,81
4	7	LNU	+1	+1	17,97
5	3,5	LKM	0	-1	17,16
6	3,5	LNU	0	+1	17,10
7	0	0	-1	0	0
8	7	0	+1	0	0
9	3,5	0	0	0	0

A resposta analisada foi a concentração de ácidos graxos formados alcançada após 6 h de hidrólise. A concentração de lipídeos presentes no efluente utilizado nesta série de testes foi de 1530 mg/L. Os resultados mostram que os ácidos graxos formados foram influenciados somente pela enzima utilizada, independente da concentração de íons sódio (Tabela 4.8). As concentrações de ácidos graxos formados variaram entre 0 e 17,97 mM e o resultado mais elevado (ensaio 4) foi obtido para os níveis máximos de íons sódio (7 mM) e tipo de preparação enzimática (LNU).

Nos estudos realizados por ENTRESSANGLES e DESNUELLE (1968), foi verificado que a hidrólise de ésteres de triacetina (TC2) por lipase pancreática e a adição de cloreto de sódio numa concentração de 0,1 M, promoveu a redução da solubilidade

de lipídeos e aumentou a concentração de micelas, resultando no aumento da interface e atividade hidrolítica da enzima. Na hidrólise dos lipídeos, o pH na interface orgânica-aquosa pode reduzir sensivelmente, devido ao acúmulo de ácidos graxos liberados pela ação lipolítica. Essa redução de pH na interface, onde o complexo enzima-substrato é formado, pode inibir a atividade da enzima e a adição de NaCl é geralmente recomendada para neutralizar as cargas negativas geradas pelos ácidos graxos formados na interface (BROCKERHOFF e JENSEN, 1974).

MASSE *et al.* (2001) testaram a suplementação de 1 g/L de NaCl na hidrólise de 8 amostras de águas residuárias de abatedouros de suínos empregando lipase pancreática PL-250 em concentrações entre 100-500 mg/L e verificaram um efeito não-significativo da suplementação de NaCl sobre a redução do tamanho das partículas de lipídeos. Esses autores formularam duas hipóteses para explicar os resultados obtidos. A primeira foi referente ao efeito de elevadas concentrações de sais de sódio no efluente que podem ter mascarado o efeito do NaCl e a segunda foi relativa a baixa concentração de íons hidrogênio na interface resultante da baixa porcentagem de hidrólise dos lipídeos obtida.

A concentração de íons sódio presentes em efluentes de abatedouros, foi estimada em 272 ± 85 mg/L e as concentrações de íons cálcio e magnésio foram de aproximadamente 50 e 20 mg/L, respectivamente (BROCKERHOFF e JENSEN, 1974; MASSE *et al.*, 2001). A concentração de íons sódio e cálcio em efluentes das indústrias de derivados lácteos não é relatada na literatura.

A análise estatística foi efetuada empregando o programa STATISTICA 6.0 e a Tabela 4.10 reúne os dados da análise dos efeitos, a estimativa de erro padrão e o teste *t* de Student's. Dentro da região experimental avaliada, verificou-se que a variável íons sódio (x_1) e o termo quadrático x_2^2 foram significativos ao nível de 95% ($p < 0,05$) de probabilidade na formação de ácidos graxos, sendo o resultado positivo representado pelo nível alto (+), lipase pancreatina LNU.

Tabela 4.10. Efeitos calculados, estimativa de erro e valores do teste t de Student's para os ácidos graxos formados na hidrólise de lipídeos do efluente

Fonte	Efeito	Erro	valores t	p
Média	1,27	± 0,95	1,33	0,2755
Sódio (x ₁)	1,27	± 1,04	1,21	0,3115
Lipase (x ₂)	0,67	± 1,04	0,64	0,5682
x ₂ ²	35,20	± 1,81	19,48	0,0003

O modelo estatístico determinado para a resposta estudada foi obtido por meio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, sendo expresso pela equação 4.3.

$$y = 0,61x_1 + 16,8x_2^2 \quad (4.3)$$

Em que: y é a variável resposta, x₁ e x₂ representam os valores codificados para concentração de íons sódio (NaCl) e o tipo de lipase empregada, respectivamente.

A significância estatística do modelo foi avaliada pelo teste F (Tabela 4.11), revelando que a regressão é significativa em 99% - nível de probabilidade. O modelo não apresentou falta de ajuste e a determinação do coeficiente de correlação (R²=0,99), mostra que 99% da variabilidade na resposta, em relação a análise dos resultados pode ser explicada pelo modelo.

Tabela 4.11. Análise de Variância do planejamento fatorial completo 2² proposto

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	p
Modelo	567,42	5	113,48	254,11	0,0004
Resíduo	1,34	3	0,45		
Total	568,42	8			

As condições estabelecidas no planejamento experimental (nível máximo de NaCl e preparação enzimática LNU) foram adotadas para realização de um experimento complementar, no qual foram determinados os ácidos graxos formados e as porcentagens de hidrólise de lipídeos e proteínas e glicerol formado, como mostrado na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Composição do efluente tratado enzimaticamente, empregando a lipase LNU (6h).

Glicerol formado (%)	Ácidos graxos formados (mM)	Porcentagem de hidrólise (%)	
		Lipídeos	Proteínas
14,4	17,97	26,2	20,7

Os resultados mostram que para efetuar a hidrólise dos lipídeos presentes no efluente não foi necessária a suplementação de agentes emulsificantes e compostos iônicos para o incremento da atividade da lipase LNU. A adoção de um pré-tratamento enzimático sem a suplementação desses compostos, em escala industrial, pode ser menos onerosa, com a redução de custos com reagentes e facilidade em algumas etapas de processo. Por meio desses resultados, foi selecionada a preparação enzimática LNU para efetuar a hidrólise de lipídeos presentes no efluente. Além de ter apresentado melhor eficiência na hidrólise dos lipídeos e remoção de proteínas, esta preparação também apresentou menor custo em relação às outras preparações de lipases testadas neste trabalho (LPP e LKM). Em recente cotação (Abril/2004), as empresas forneceram os seguintes valores, mostrados na Tabela 4.13:

Tabela 4.13. Cotação das preparações de lipase LPP, LKM e LNU.

Preparação de lipase	Custo da preparação (U\$/Kg)	Custo por litro de efluente tratado (U\$/L)
LPP (Sigma)	1280,00	6,40
LKM (Kin Master)	256,00	1,28
LNU (Nuclear)	78,00	0,33

Desta forma verifica-se que a LNU foi a preparação de lipase que ofereceu melhor relação custo/benefício para a utilização no pré-tratamento enzimático.

4.5. Hidrólise de Lipídeos com a Preparação Enzimática LNU

Foram ainda realizados testes com o objetivo de verificar o desempenho da preparação LNU na hidrólise dos triglicerídeos contidos em efluentes, variando a concentração enzimática (3-5 mg/mL), concentração de íons cálcio (0-10 mM) e ajuste de pH com soluções alcalinizantes NaOH e NaHCO₃ (1M). Todos os ensaios foram realizados na temperatura de 37°C, agitação de 200 rpm e tempo de hidrólise de 24 h. A

concentração de lipídeos contidos no efluente utilizado nestes ensaios foi de 4680 mg/L. As condições experimentais empregadas são mostradas na Tabela 4.14.

A influência das diferentes condições testadas na hidrólise dos lipídeos presentes no efluente foi expressa em termos de ácidos graxos formados (mM) em função do tempo, são apresentadas na Figura 4.12, tomando por base os dados detalhados no Apêndice 8.4.C.

Tabela 4.14. Hidrólise de lipídeos das águas residuárias empregando a lipase LNU

Ensaio	Variáveis reais			Variáveis codificadas		
	Enzima (mg/mL)	CaCl ₂ (mM)	Solução Alcalinizante	Enzima	CaCl ₂	Alcalinizante
1	3	0	NaOH	-1	-1	-1
2	5	0	NaOH	1	-1	-1
3	3	10	NaOH	-1	1	-1
4	5	10	NaOH	1	1	-1
5	3	0	NaHCO ₃	-1	-1	1
6	5	0	NaHCO ₃	1	-1	1
7	3	10	NaHCO ₃	-1	1	1
8	5	10	NaHCO ₃	1	1	1

A concentração de ácidos graxos formados na hidrólise de lipídeos variou de 19,23 a 54,36 mM (Figura 4.13). A incubação do meio reacional com concentração enzimática de 5 mg/mL (Ensaio 2, 4, 6 e 8), promoveu um aumento na velocidade de formação de ácidos graxos quando comparado aos ensaios realizados empregando uma concentração de 3 mg/mL (Ensaio 1, 3, 5 e 7). A maior velocidade de formação de ácidos graxos (5,47 mM/h) foi observada no ensaio 4 (5 mg/mL de enzima, 10 mM de íons cálcio e ajuste de pH com NaOH) e a menor velocidade (2,52 mM/h) foi observada no ensaio 5 (3 mg/mL de enzima e ajuste de pH com NaOH).

Em relação a influência da solução alcalinizante (NaOH e NaHCO₃) não foi observado o comportamento anteriormente descrito nos testes de hidrólise do soro de queijo, nos quais foi verificado que a utilização da solução de NaHCO₃ inibiu completamente a ação da lipase LKM. Por meio dessa série de testes, verifica-se que a ação da LNU foi independente do tipo de solução alcalinizante empregada no ajuste do pH do efluente. A utilização de NaOH ou NaHCO₃ como soluções alcalinizantes resultaram em uma concentração máxima de ácidos graxos, respectivamente, de 54,36 mM (Ensaio 4) e 41,18 mM (Ensaio 6).

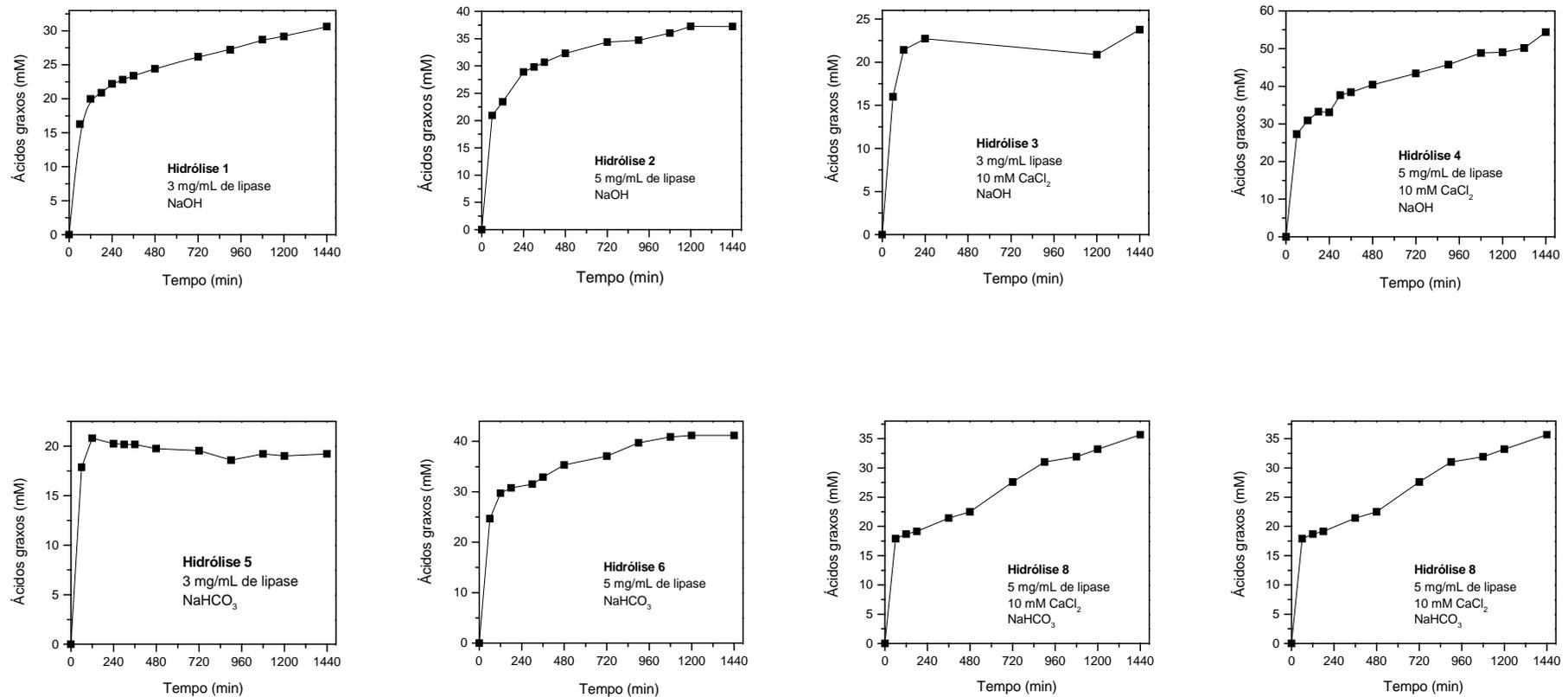


Figura 4.12. Perfil de hidrólise dos lipídeos do efluente, empregando a lipase pancreatina (LNU), temperatura (37°C), agitação mecânica (200 rpm) em função do tempo.

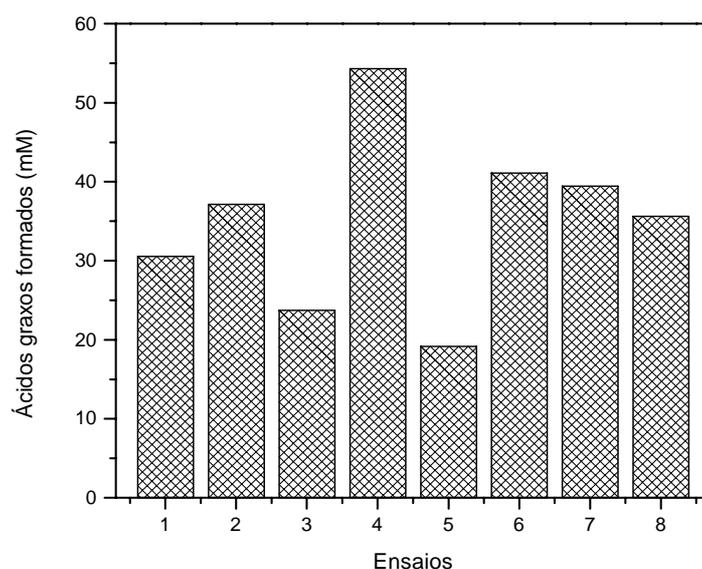


Figura 4.13. Concentração de ácidos graxos formados pela hidrólise de lipídeos, anterior aos testes de biodegradabilidade empregando a lipase LNU.

A suplementação de íons cálcio foi mais benéfica nos ensaios realizados com pH ajustado com NaOH, promovendo um incremento na concentração final de ácidos graxos tanto para meios incubados com baixa ou alta concentração de enzima. Nos testes realizados com pH ajustado com NaHCO₃, o efeito benéfico do CaCl₂ foi mais pronunciado apenas nas hidrólises que utilizaram baixa concentração de enzima (Ensaio 5 e 7).

Em meios reacionais suplementados com íons cálcio, a velocidade inicial de hidrólise foi maior, 4,77 mM/h (Ensaio 7), quando comparado aos ensaios realizados sem a adição destes íons, 3,36 mM/h (Ensaio 5). Observa-se ainda que a ausência de íons cálcio promoveu a redução da atividade hidrolítica, após um período de 15 h de reação (Ensaio 2, 5 e 6). Nos ensaios realizados na presença desses íons não houve interrupção da atividade da lipase, ausência da fase estacionária. O efeito dos íons cálcio sobre a atividade de lipases é geralmente considerado benéfico, sendo capaz de alterar a conformação da enzima, ou seja, íons cálcio agem como co-fator da lipase promovendo um aumento de sua atividade catalítica (SHARMA *et al.*, 2001). Sugere-se que o cálcio reduz a acidez livre produzida durante a hidrólise pela formação de sais de cálcio insolúveis, permitindo o prosseguimento da reação hidrolítica.

A necessidade do cálcio é, provavelmente, para compensar a repulsão eletrostática criada entre a enzima e grupos carboxílicos dos sais biliares (SHAHANI, 1975). De acordo com os resultados obtidos, a porcentagem de hidrólise de lipídeos mais elevada foi obtida nas seguintes condições experimentais: concentração enzimática de 5 mg/mL, 10 mM de CaCl₂ e ajuste de pH 8,0 com solução alcalinizante NaOH (Ensaio 4).

Ao final do pré-tratamento enzimático foram analisadas as porcentagens de hidrólise de lipídeos e proteínas e glicerol formado na amostra contendo maior concentração em ácidos graxos (54,36 mM) como mostrado na Tabela 4.15. O efluente assim tratado foi submetido a teste de biodegradabilidade anaeróbia, conforme descrito na seção 3.6.

Tabela 4.15. *Composição do efluente tratado enzimaticamente, empregando a lipase LNU.*

Glicerol formado (%)	Ácidos graxos formados (mM)	Porcentagem de hidrólise (%)	
		Lipídeos	Proteínas
20,0	54,36	32,8	32,5

4.6. Testes de Atividade Metanogênica

Os resultados obtidos nos testes de biodegradabilidade anaeróbia dos efluentes bruto e pré-tratado enzimaticamente (hidrolisado) são mostrados na Figura 4.14 e Apêndice 8.5.A. As condições aplicadas ao efluente pré-tratado enzimaticamente foram previamente estabelecidas (5 mg/mL de lipase, 10 mM de íons cálcio e ajuste de pH = 8,0 com solução alcalinizante NaOH), por um período de 24 h. O esquema representativo dos testes é mostrado na Figura 4.15.

O volume de gás metano formado, num período de 28 dias, foi de aproximadamente 220,0 e 276,5 ± 28,5 mL, para os efluentes bruto e pré-tratado enzimaticamente, respectivamente, sendo constatado um aumento de 25,68 ± 13% no volume de gás formado com o pré-tratamento enzimático.

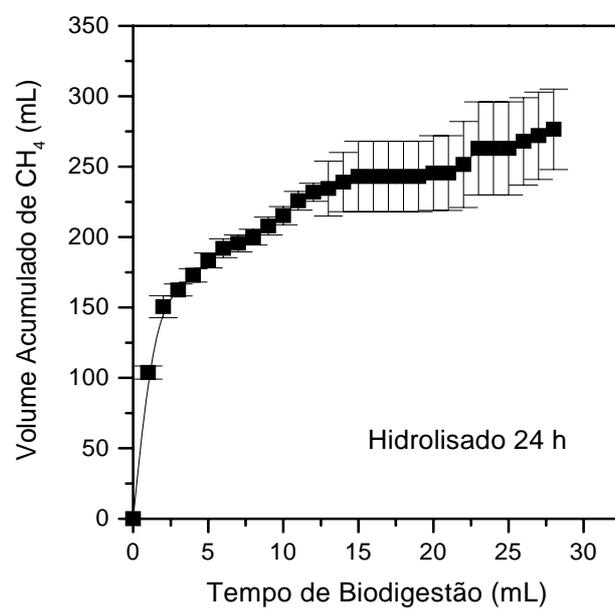
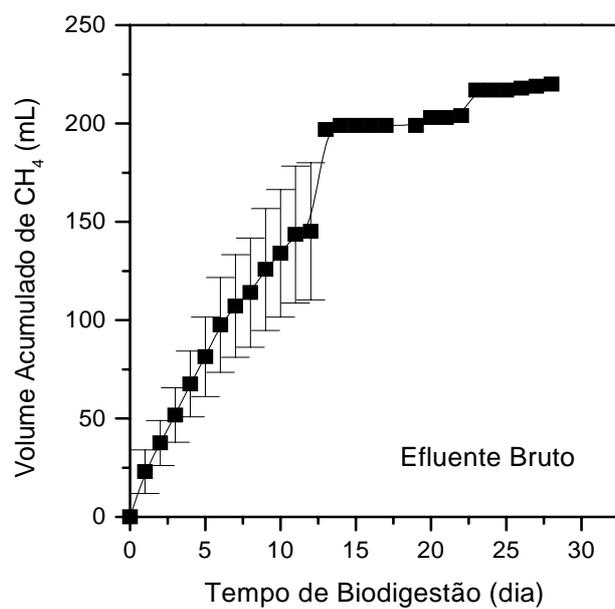


Figura 4.14. Cinética de biodegradação do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente com a preparação de lipase LNU (35 °C, 28 dias, agitação 200 rpm).



Figura 4.15. Esquema representativo dos testes de biodegradabilidade anaeróbia (temperatura 35°C, agitação de 200 rpm).

O volume de gás metano foi elevado nos primeiros 15 dias para ambos efluentes (bruto e hidrolisado) tendo um comportamento cinético de reações de 1° ordem e após esse período, o volume de metano formado não aumentou com o tempo, comportamento cinético de reações de ordem zero (fase estacionária). Esse comportamento pode ser explicado pela redução da concentração de matéria orgânica contida no efluente e pelo decréscimo do pH do meio reacional, o que reduz a capacidade de formação de gás metano. As arqueas metanogênicas têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 6,6 e 7,4 e as bactérias produtoras de ácidos orgânicos têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 5,0 e 6,0, mas podem se mostrar ativas mesmo para valores de pH próximos a 4,5. Na prática, isso significa que a produção de ácidos em um reator pode continuar livremente, apesar da produção de metano ter sido interrompida devido aos baixos valores de pH (ISOLDI *et al.*, 2001).

A análise do perfil cinético de produção de metano mostrado na Figura 4.16 indica que a velocidade inicial de produção de metano determinada na biodegradação do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente foi de aproximadamente 53 mL/dia e 170 mL/dia, respectivamente. Após esse período a velocidade de formação de metano foi sensivelmente reduzida.

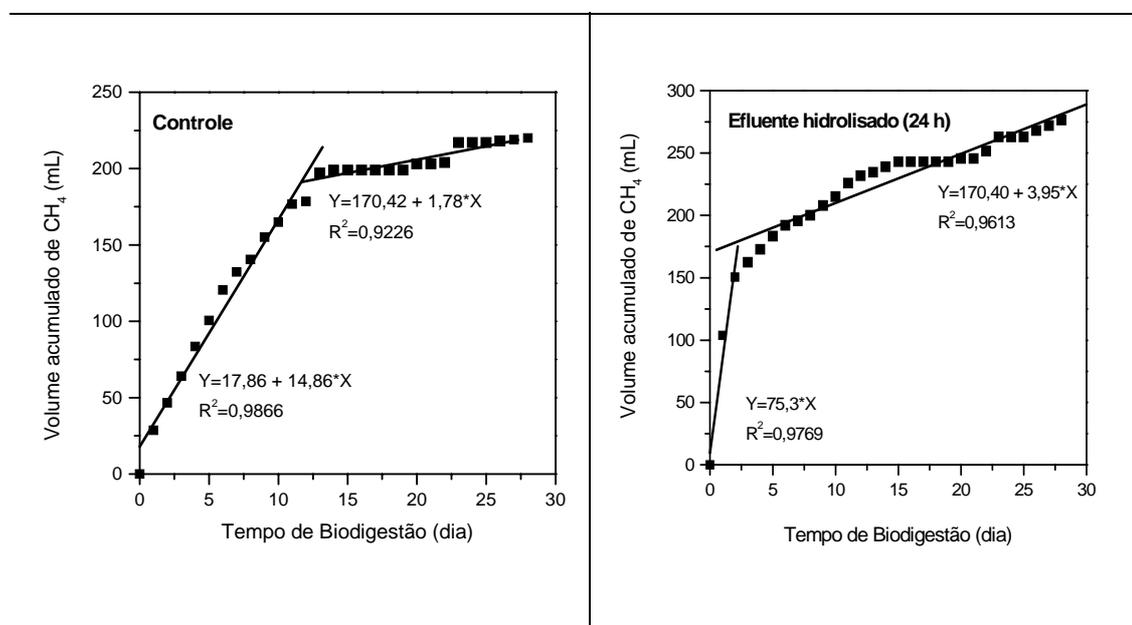


Figura 4.16. Perfil cinético dos testes de biodegradabilidade do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente com a lipase LNU (35 °C, 28 dias, agitação 200 rpm).

4.6.1. Efeito do Tempo de Hidrólise Enzimática na Biodegradabilidade Anaeróbia

Para verificar o efeito da concentração de ácidos graxos presentes no efluente tratado enzimaticamente na biodigestão anaeróbia, testes foram efetuados com efluentes tratados em diferentes tempos de hidrólise (4 a 24 h). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos no efluente bruto (sem tratamento, controle 1) e na amostra de efluente suplementada com enzima no tempo inicial de biodigestão (controle 2). Nesse último caso, as etapas de hidrólise e biodigestão foram efetuadas simultaneamente. Essa metodologia permitiu verificar a influência da concentração de ácidos graxos livres nas amostras submetidas a biodigestão anaeróbia.

Os valores de pH e as concentrações de ácidos graxos livres, glicerol e proteínas encontrados nas amostras após a etapa de hidrólise por diferentes tempos é mostrada na Tabela 4.16. Os testes de hidrólise foram realizados em reatores com agitação mecânica, a 37°C e 200 rpm.

Tabela 4.16. Influência de tempo de hidrólise nas características do efluente

Tempo de Hidrólise (h)	Ácidos Graxos Livres (mM)	Glicerol (%)	Porcentagem de Hidrólise (%)	Redução de Proteína (%)	pH
C ₁	2,70 ± 0,50	0,376 ± 0,08	0	0	5,25
C ₂	2,70 ± 0,50	0,376 ± 0,08	0	0	8,04 ± 0,04
4	24,65 ± 13,25	0,521 ± 0,05	28,6 ± 8,9	28,0	5,08 ± 0,52
8	31,65 ± 12,45	0,582 ± 0,07	36,1 ± 6,5	29,1	4,36 ± 0,20
12	36,20 ± 13,10	0,613 ± 0,06	39,5 ± 6,8	32,7	4,14 ± 0,21
24	38,65 ± 13,55	0,620 ± 0,06	40,0 ± 6,9	31,0	4,07 ± 0,20

As concentrações de ácidos graxos livres obtidas no pré-tratamento enzimático foram superiores a 24,66 ± 13,25 mM, para um tempo de hidrólise de 4 h e o valor máximo obtido foi de 38,63 ± 13,53 mM, ao final de 24 h, correspondendo a porcentagem de hidrólise de 28,6 ± 8,9 e 40,0 ± 6,9%, respectivamente. A etapa de hidrólise foi também satisfatória com relação a degradação de proteínas, alcançando valores da ordem de 30%, independente do tempo de reação. A hidrólise de proteínas é creditada a presença de proteases na preparação enzimática (LNU).

O decréscimo de pH observado para as amostras hidrolisadas por diferentes tempos (4, 8, 12 e 24 h) foi provavelmente devido à hidrólise dos lipídeos (formação de

ácidos graxos) bem como na hidrólise das proteínas (formação de aminoácidos de caráter ácido como ácido glutâmico e aspártico). A porcentagem desses aminoácidos contidos na caseína é de 16,1% e os aminoácidos carregados positivamente (caráter básico), arginina, lisina e histidina é de 12,6%, num total de 199 resíduos de aminoácidos contidos na caseína do leite (LEHNINGER, 1976).

Por outro lado, o ajuste do valor de pH do efluente, com solução alcalinizante, pode também ter promovido a solubilização das proteínas, pois em pH ácido, as proteínas se encontram insolúveis (CHARNEY e TOMARELLI, 1947), auxiliando, desta forma, a hidrólise desses compostos.

As curvas de formação de metano e perfil cinético são apresentadas nas Figuras 4.17 e 4.18, respectivamente. Os resultados obtidos com relação as concentrações de proteínas, açúcares redutores simples, matéria orgânica (DQO), ácidos graxos livres, valor de pH, turbidez (cor) e volume de metano formado após a etapa de biodigestão, são mostrados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17. Biodegradabilidade anaeróbia de efluentes pré-tratados enzimaticamente

Tempo de Hidrólise (h)	Redução				Ácidos Graxos Livres (mM)	pH	Volume de CH ₄ (mL)
	Açúcares Redutores Simples (%)	DQO (%)	Proteínas (%)	Cor (%)			
C ₁	89,9 ± 1,97	45,0	87,9 ± 0,1	13,9 ± 1,3	15,58	5,34	209 ± 47
C ₂	97,7 ± 0,45	76,4	88,8 ± 0,8	68,7 ± 0,4	16,57	5,31	354 ± 34
4	99,2 ± 0,16	69,1	89,6 ± 0,2	75,8 ± 0,2	9,85	5,65	403 ± 4
8	99,9 ± 0,02	70,9	89,1 ± 0,4	76,5 ± 0,7	12,35	5,50	383 ± 2
12	100 ± 0	78,2	88,7 ± 0,6	80,3 ± 0,4	7,03	5,81	445 ± 29
24	99,2 ± 0,16	80,9	89,6 ± 0,1	77,5 ± 0,2	14,52	5,42	437 ± 0

O volume final de metano formado na biodigestão do efluente bruto (209 ± 47 mL) foi inferior aos obtidos para todas as amostras de efluentes hidrolisados. O efluente tratado por 12 h resultou na maior formação de metano (445 ± 29 mL) e o efluente incubado com enzima no tempo inicial da biodigestão (C₂) obteve um incremento de 69% em relação ao controle (C₁). Nota-se pela Figura 4.17 que a partir do 4º dia de biodigestão a velocidade de formação foi reduzida em função da elevada velocidade de conversão da matéria orgânica em compostos de baixa massa molar como metano e gás carbônico obtidos nos primeiros dias de reação.

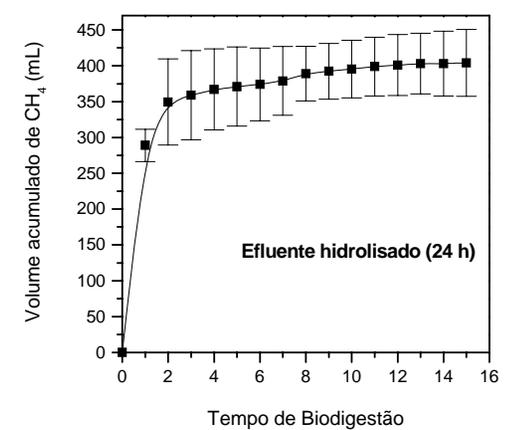
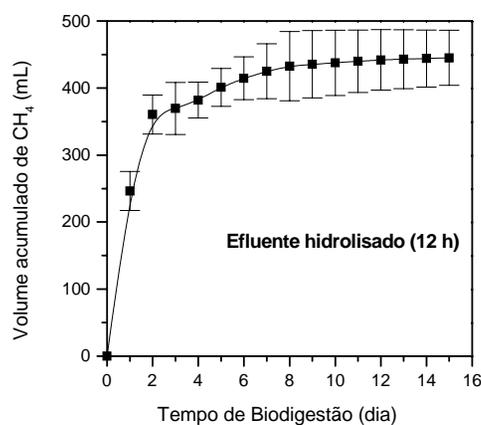
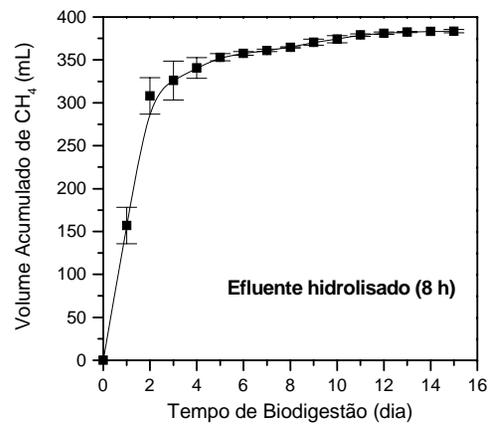
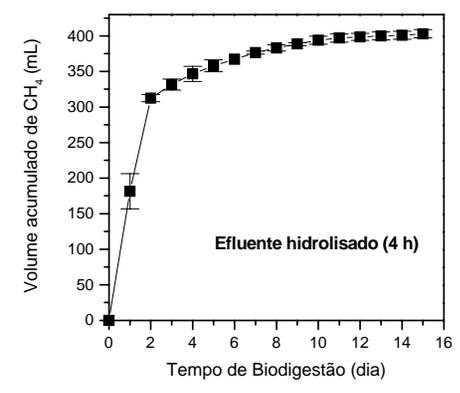
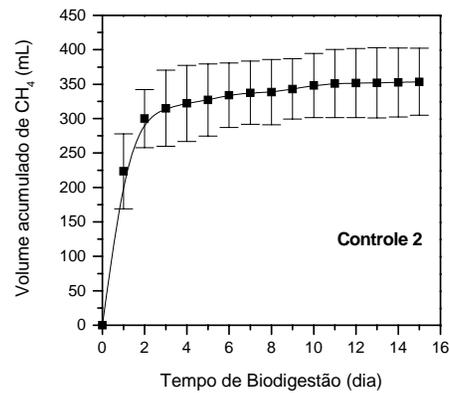
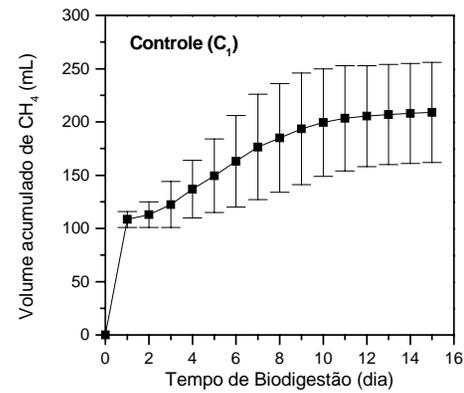


Figura 4.17. Cinética de biodegradação do efluente tratado com LNU, variando o tempo de hidrólise de 4, 8, 12 e 24 h e os controles suplementado com enzima, ajuste de pH e íons cálcio e o efluente bruto.

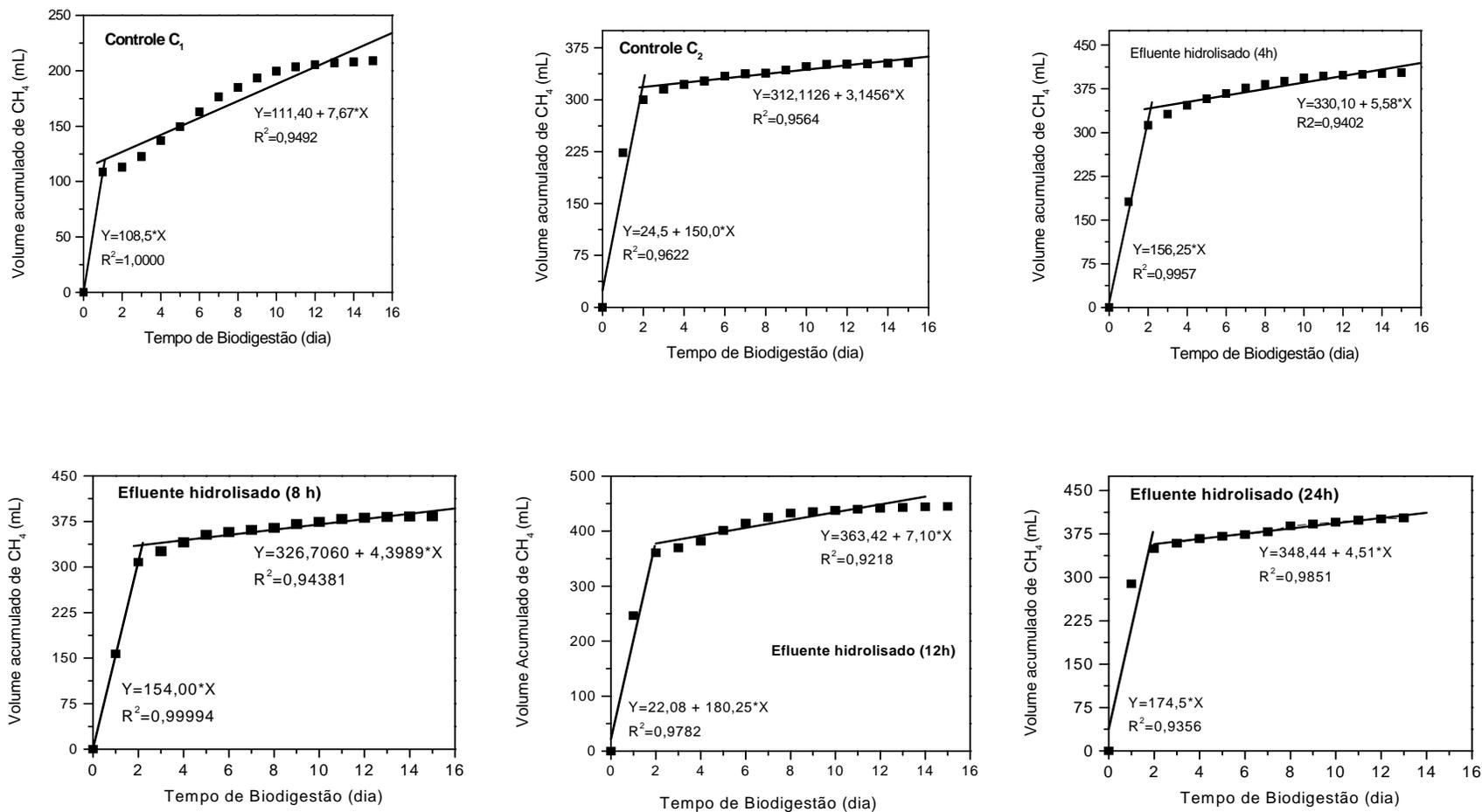


Figura 4.18. Perfil cinético dos testes de biodegradabilidade do efluente bruto e efluente pré-tratado enzimaticamente com a lipase LNU (35 °C, 15 dias, agitação 200 rpm).

A análise do perfil cinético de produção de biogás mostrado na Figura 4.18 indica que a velocidade inicial de formação desse produto determinada na biodegradação do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente por um período de 12 h foi de aproximadamente 59 ± 4 mL/dia e 180 ± 10 mL/dia nas primeiras 48 h de biodigestão, respectivamente. Todas as amostras de efluente pré-tratados enzimaticamente apresentaram velocidade inicial 3 vezes superior ao constatado na amostra de efluente bruto (Controle 1). Após esse período, a velocidade de formação de biogás foi reduzida sensivelmente, com valores próximos a zero, para ambos ensaios.

A elevada concentração de ácidos graxos formados na etapa de hidrólise enzimática não promoveu inibição na biodegradação pelos microrganismos anaeróbios, provavelmente devido à grande velocidade de degradação obtida nos primeiros dias. Entretanto, estudos descritos na literatura sugerem que concentrações de ácido oleico superiores a 280 mg/L (1 mM) inibem a ação de microrganismos acetogênicos (KOSTER e CRAMER, 1987). Por outro lado, MASSE *et al.* (2001) demonstraram que a aplicação de lipase pancreática PL-250 na hidrólise de lipídeos de efluentes de abatedouros por um período de 4 h e concentração de 250 mg/L, promoveu a redução de 0,7% do material graxo contido neste efluente, com formação de ácidos graxos livres numa concentração de 15,5 mg/L. Esses pesquisadores reportaram ainda que essa concentração foi resultante dos ácidos graxos presentes no meio reacional e que alguns ácidos graxos formados poderiam estar adsorvidos em moléculas de lipídeos. No presente estudo, não foi estimada a concentração de lipídeos contidos no meio, mas foi verificada uma redução considerável da concentração de lipídeos, o que provavelmente auxiliou a velocidade de formação de metano.

Apesar da concentração de açúcares redutores simples não ter sido alterada na hidrólise, houve uma remoção total (valores entre 98-100%) desses compostos na etapa da biodigestão. No caso da amostra de efluente bruto (Controle 1) a remoção dos açúcares foi de aproximadamente 90%. A biodegradabilidade de açúcares como lactose é geralmente mais acelerada e com elevada eficiência de remoção em condições anaeróbias, quando comparada aos outros compostos orgânicos como lipídeos e proteínas (PAVLOSTHATIS e GIRALDO-GOMEZ, 1991).

A redução da concentração de proteínas foi similar em todas as amostras analisadas, com porcentagens próximas a 90%. Comparando os resultados obtidos na biodegradação anaeróbia das proteínas, nota-se que o lodo anaeróbio utilizado não

sofreu inibição pelo substrato por ser uma cultura aclimatada, coletada em estação de tratamento de efluentes de laticínios. O pré-tratamento enzimático acelerou a biodegradação desses compostos, mas não promoveu um aumento na remoção de matéria orgânica em termos de DQO.

A preparação enzimática LNU contém enzimas contaminantes como proteases, o que torna atrativo a sua aplicação na hidrólise da caseína, principal proteína presente no leite e em efluentes de indústrias de derivados lácteos (VIDAL *et al.*, 2000). Em condições anaeróbias possui menor biodegradabilidade quando comparada com a lactose (PAVLOSTATHIS e GIRALDO-GOMEZ, 1991). A hidrólise das proteínas, especificamente caseína, por meio de microrganismos, depende da aclimação da biomassa (VIDAL *et al.*, 2000). Esses pesquisadores relataram que a produção de biogás por biodegradabilidade anaeróbia da caseína (3,7 g DQO/L.d) empregando lodo não-aclimatado (4,5 g SSV/L.d) foi menor (0,25 mL CH₄/h), com fase lag de aproximadamente 50 h, se comparada com a produção de gás por lodo aclimatado (0,79 mL CH₄/h). Entretanto, a caseína não inibe a biodegradabilidade anaeróbia em concentrações que variam de 0 a 3 g/L (PERLE *et al.*, 1995). Os produtos formados pela hidrólise de proteínas também não inibiram a ação de microrganismos anaeróbios sobre a formação de biogás. PERLE *et al.* (1995) não observaram inibição na formação de biogás empregando microrganismos aclimatado e não-aclimatado suplementados com aminoácidos provenientes da hidrólise da caseína, obtendo um volume de biogás entre 250-300 mL para ambos meios de cultura, por um período de 180 h.

Os principais produtos formados na biodegradação das proteínas, em condições anaeróbias, são os íons amônio (NH₄⁺) e sulfeto (S²⁻) e aminoácidos. A amônia produzida pode ser tóxica a microrganismos metanogênicos (SOUBLES *et al.*, 1994). MACCHARTHY (1964) relatou que concentrações de nitrogênio amoniacal na faixa de 50-200 mg/L estimulam a atividade das bactérias metanogênicas, mas em elevadas concentrações pode ser tóxica, dependendo da espécie microbiana. De acordo com OMIL *et al.* (1995), concentrações de amônia molecular (NH₃) entre 25-140 mg/L podem inibir o tratamento biológico de espécies mesofílicas. O pH é um importante parâmetro para determinar a concentração da amônia na forma molecular ou iônica. Na forma livre ela é mais tóxica, mais em pH alcalino ela se encontra na forma ionizada. Os resultados obtidos no presente trabalho quanto a formação de metano, sugerem que os microrganismos anaeróbios não sofreram inibição pelos produtos resultantes da

biodegradação da proteína, como amônia. Possivelmente, grande concentração de gás amônia produzido se encontrava na forma ionizada, íons amônio, formados pela elevação do pH do meio reacional após a biodegradabilidade anaeróbia.

A espécie alcalina mais importante no sistema anaeróbio é o íon bicarbonato (HCO_3^-), cuja origem é a liberação de espécies alcalinas a partir do metabolismo de proteínas, principalmente, a amônia ($\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{OH}$) (amonificação) e de formas oxidadas do enxofre ($\text{S}^{2-}/\text{HS}^-$) e pela hidrólise de ácidos orgânicos fracos. A alcalinidade dessas substâncias é transferida ao bicarbonato por meio da reação com o CO_2 , presente em grande concentração no sistema anaeróbio. Esse aumento do pH no meio reacional pode ser benéfico, pois a redução acentuada do pH ocasiona o acúmulo de ácidos orgânicos voláteis no sistema, resultando baixa eficiência na formação de gás metano (ISOLDI *et al.*, 2001). O efeito do pH sobre o processo de digestão se manifesta de duas formas, afetando a atividade de enzimas e a toxicidade de inúmeros compostos. A temperatura também influencia no valor de pH do meio reacional, porque em baixas temperaturas ocorre um aumento no valor do pH, devido a concentração de DQO digerida diminuir ocasionando uma queda na produção de CO_2 . Oscilações bruscas de temperatura diminuem a eficiência do processo porque provocam um acúmulo de ácido propiônico. Por isso, é mais importante manter um reator à temperatura constante do que mantê-lo na faixa ótima de temperatura.

A aplicação da lipase LNU no pré-tratamento reduziu sensivelmente a concentração de matéria orgânica em termos de DQO, sendo constatado para o controle C_1 uma redução de 45,0%, enquanto que para as amostras hidrolisadas foram obtidas reduções superiores a 69%, atingindo níveis máximos de 80,9%, com o efluente pré-tratado por 24 h. Foi também observada uma flotação de lipídeos não biodegradados, apenas para amostra de efluente bruto. É importante ressaltar a eficiência de remoção de DQO da ordem de 74,4% obtida no controle C_2 (hidrólise e biodigestão simultâneas). Essa eficiência foi superior aos ensaios efetuados com efluentes pré-tratados nos tempos de hidrólise de 4 e 8 h, isto é, 69,1 e 70,9 %, respectivamente.

Essa grande eficiência na remoção de DQO se deve a biodegradabilidade dos lipídeos e ácidos graxos presentes no efluente hidrolisado. A redução da concentração de ácidos graxos pode ser também explicada pelo decréscimo de ácidos contidos no efluente, por exemplo, para uma concentração inicial de $38,63 \pm 13,53$ mM (tempo zero da etapa de biodigestão anaeróbia), foi constatado uma redução para 14,52 mM de ácidos

graxos ao final de 15 dias de biodigestão.

O efeito da biodigestão anaeróbia sobre o efluente bruto e hidrolisado em termos de turbidez (remoção da cor) foi quantificada por varredura em espectrofotometria nas regiões do ultra-violeta (400-200 nm) e do visível (760-400 nm) (Figura 4.19) e também visualizada pela fotografia mostrada na Figura 4.20.

Todas as amostras tratadas enzimaticamente apresentaram uma elevada eficiência na remoção de cor na faixa de comprimento de onda analisada. Isto se deve à biodegradabilidade dos lipídeos e ácidos graxos presentes no efluente, principais sólidos em suspensão contidos no efluente.

A remoção de compostos orgânicos do efluente foi influenciada também pela suplementação de íons cálcio (CaCl_2), ajuste do pH com NaOH e pela temperatura adotada nos testes de biodegradabilidade anaeróbia.

O processo de formação de grânulos de lodo anaeróbio pode ser dividido em 4 etapas: (1) transporte de células para a superfície de outras células, (2) adsorção celular inicial reversível por interações físico-químicas, (3) adsorção irreversível microbiana por adesão e/ou compostos poliméricos e (4) multiplicação e desenvolvimento celular de grânulos (SCHMIDT e AHRING, 1996). Alguns fatores podem influenciar na aceleração do processo de formação desses grânulos, como a suplementação de íons cálcio em reatores anaeróbios (YU *et al.*, 2001). CAIL e BARFORD (1985) afirmaram que a formação de grânulos de lodo foi estimulada na presença de 150 mg/L desses íons. Estudos realizados por YU *et al.* (2001), mostraram que concentrações inferiores a 300 mg/L aumentaram significativamente a formação de grânulos, mas em concentrações superiores a 600 mg/L foi observado um efeito negativo, devido, provavelmente, ao aumento de cargas positivas na parede celular, o que pode ter promovido repulsão eletrostática.

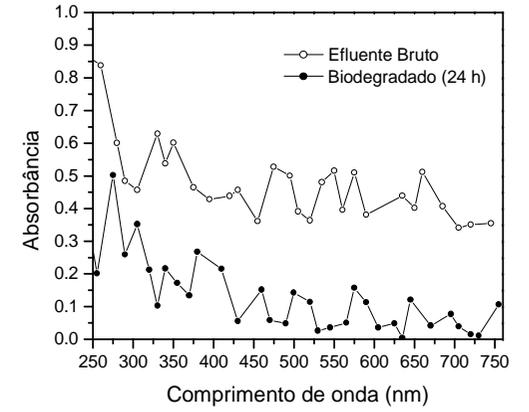
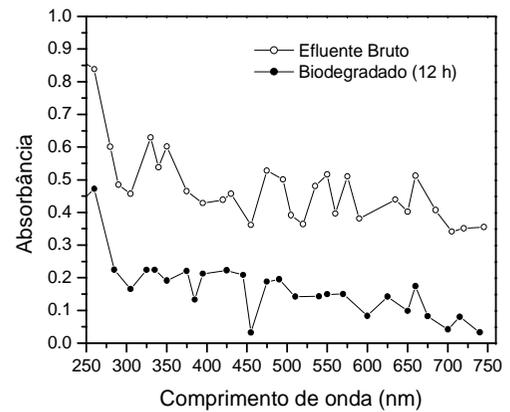
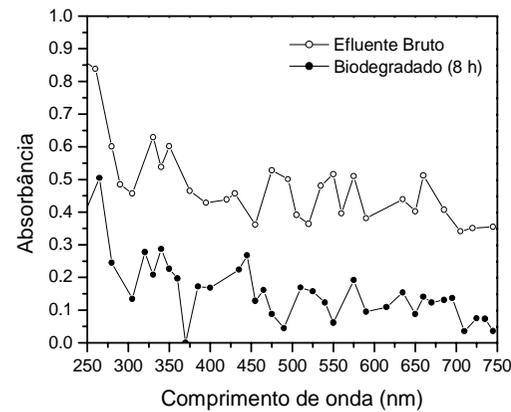
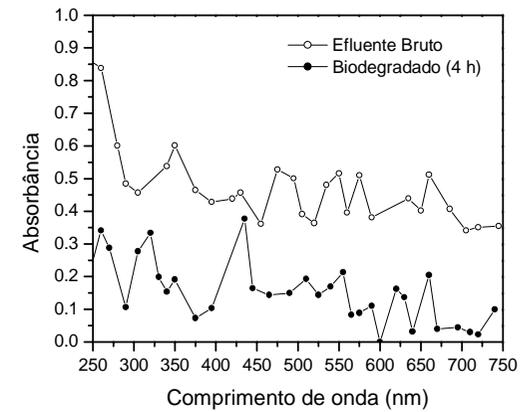
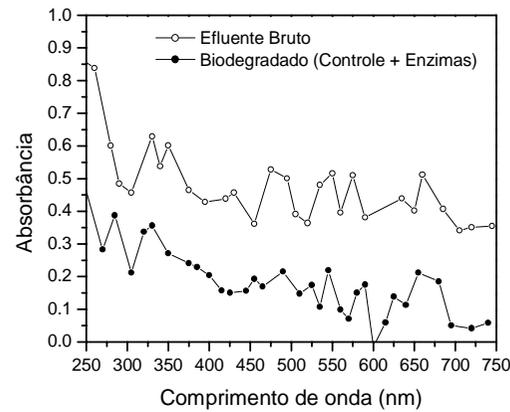
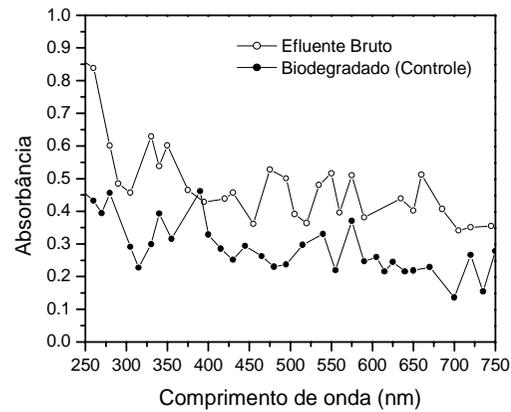


Figura 4.19. Determinação de cor do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente por varredura nas regiões do ultra violeta e do visível após 15 dias de biodegradabilidade anaeróbia.

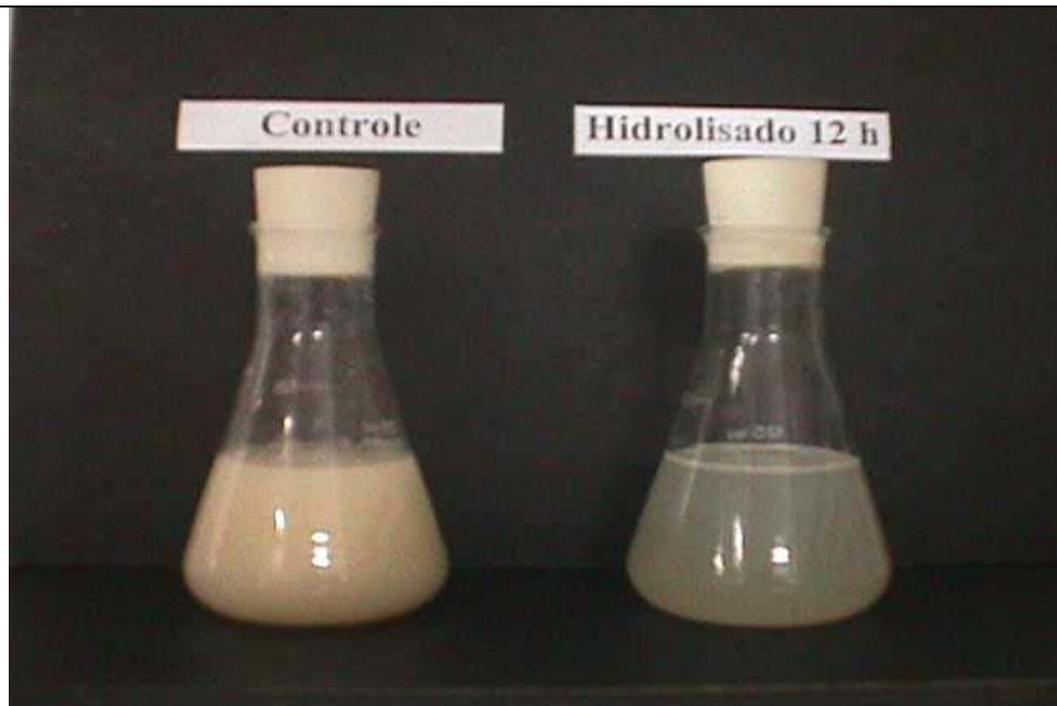


Figura 4.20. Amostras do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente por um período de 12 h após a etapa de biodigestão.

A presença de íons cálcio estimula a formação de grânulos por meio de reações com macromoléculas presentes na superfície microbiana, como polissacarídeos e/ou proteínas, para a formação de complexos estáveis (YU *et al.*, 2001). Esses complexos possuem cargas negativas, compostos aniônicos, e a adesão microbiana necessita desses íons para promover a ligação entre os microrganismos anaeróbios por ligações polissacarídeo-polissacarídeo e célula-polissacarídeo (YU *et al.*, 2001). Os íons cálcio são essenciais para a integridade do biofilme porque promovem a interação entre grupos funcionais secundários, como as hidroxilas (OH), presentes em açúcares adjacentes de diferentes células e, conseqüentemente, influenciam na ligação de macromoléculas entre células microbianas (YU *et al.*, 2001).

A biodegradação dos lipídeos é dificultada por fatores físico-químicos como baixa solubilidade em água e a semi-solidificação de alguns lipídeos à temperatura ambiente, resultante da elevada concentração de ácidos graxos saturados com 10-18 átomos de carbono. Nos testes efetuados a utilização de solução alcalinizante mostrou ser benéfica à hidrólise enzimática de lipídeos, bem como na biodigestão, promovendo a

saponificação dos ácidos graxos formados na hidrólise dos lipídeos. Comportamento similar foi observado por MOUNEIMNE *et al.* (2003), na utilização de alcalinizantes (NaOH) para emulsificação dos ácidos graxos liberados nas reações de hidrólise, aumentando a biodegradabilidade destes compostos. Em meios com ajuste de pH em 6,5 apenas 19,5% dos ácidos graxos se encontram saponificados ou ionizado e em meios com pH 8,5, a porcentagem de saponificação foi aumentada para 91,5% (MOUNEIMNE *et al.*, 2003).

O ajuste de pH em 8,0 é considerada a faixa ótima para a atividade acidogênica microbiana, para a formação de ácidos de baixa massa molar como ácidos acético e propiônico, etapa intermediária na formação de biogás (CH₄ e CO₂) (PENAUD *et al.*, 1997). No presente trabalho, a concentração de NaOH utilizada no pré-tratamento enzimático (2,4-3,2 g/L) não resultou na inibição aos microrganismos anaeróbios. KUGELMAN e MCCARTY (1965) relataram a completa inibição da atividade metanogênica com concentrações de NaOH em torno de 10-16 g/L. Elevadas concentrações de soluções alcalinizantes podem formar compostos extremamente tóxicos aos microrganismos anaeróbios, reduzindo a afinidade da biomassa microbiana pelo substrato.

A temperatura é outro importante parâmetro na biodegradabilidade anaeróbia, influenciando na redução da viscosidade do meio reacional com o aumento da turbulência hidráulica e na conversão da matéria orgânica em biogás (MAHMOUD *et al.*, 2003). Em temperaturas mais elevadas, a viscosidade do meio reduz devido ao decréscimo das forças de cisalhamento hidráulico, o que facilita o contato da biomassa microbiana com o efluente a ser tratado (MAHMOUD *et al.*, 2003). Reatores anaeróbios que operam em baixas temperaturas necessitam de suplementação de energia para aumentar a eficiência dos microrganismos anaeróbios. A conversão da matéria orgânica em biogás também é proporcional à temperatura porque a cinética de biodegradação desses compostos aumenta com o aumento da temperatura. Esse comportamento reflete nas características do lodo anaeróbio, pois biodegradação reduzida pode resultar na flotação da biomassa e má formação de grânulos de lodo (MAHMOUD *et al.*, 2003).

Estudos relatados na literatura mostram uma grande eficiência na formação de biogás e remoção de DQO em reatores anaeróbios que operam à temperatura de 35°C (HAWKES *et al.*, 1995; GAVALA *et al.*, 1999; LEAL *et al.*, 2002; PEREIRA, 2004) e

devido a esse fato, a temperatura adotada nos testes de biodegradabilidade do presente trabalho foi de 35°C.

MASSE *et al.* (2003) observaram a biodegradabilidade anaeróbia de efluente de abatedouro em reatores anaeróbios de batelada seqüencial a 25°C, suplementado com 2 g/L de gordura de porco e pré-tratado com lipase pancreática PL-250 na concentração de 250 mg/L, por um período de 5,5 h. Os autores utilizaram também o efluente bruto, sem adição de gordura de porco (C₁) e o efluente suplementado com gordura de porco (C₂), como controles. A porcentagem de hidrólise da gordura de porco obtida, com pré-tratamento enzimático, foi de aproximadamente 35%. A eficiência de formação de gás metano com o efluente pré-tratado enzimaticamente foi comparada com os controles C₁ e C₂ e os resultados obtidos mostram que o efluente pré-tratado enzimaticamente obteve um ligeiro acréscimo na formação de gás metano de 82% sobre o controle C₂ (78%), se comparados com o controle (C₁), adotado como referencial (0%), por um período de 69 h. Esses autores sugeriram que o baixo rendimento na formação de gás metano obtido pelo efluente pré-tratado enzimaticamente foi a baixa temperatura adotada na biodegradabilidade anaeróbia (25°C). Possivelmente, temperaturas mais elevadas poderiam obter resultados mais satisfatórios.

Nos testes de biodegradabilidade anaeróbia de águas residuárias das indústrias de abate de frango, realizados por PEREIRA (2004), a temperatura adotada nesses testes foi de 35°C. Foram utilizadas enzimas comerciais de fontes microbiana (*Candida rugosa*-LCR) e de pâncreas de porco (LKM e LNU), no pré-tratamento dessas águas residuárias, por um período de 12 h. A eficiência de formação de gás metano foi de 107 mL para o efluente bruto e com o pré-tratamento enzimático foram obtidos volumes finais de metano de 500 ± 29 mL, para a lipase LCR, 523 ± 7 mL, para a lipase LKM e 510 ± 22 mL para a lipase LNU. Os rendimentos de formação de gás metano, obtidos para os efluentes pré-tratado enzimaticamente foram aproximadamente 5 vezes superior ao efluente bruto. Esses resultados confirmam que a aplicação de enzimas hidrolíticas no pré-tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos, anterior à etapa de biodegradabilidade anaeróbia, é importante na remoção de compostos orgânicos presentes nessas águas.

5. CONCLUSÕES

O presente projeto teve como objetivo principal viabilizar tecnicamente a aplicação de um tratamento enzimático para a remoção de gorduras dos efluentes gerados por indústrias de produtos lácteos. O enfoque foi baseado no uso de preparações de lipases disponíveis comercialmente. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, e nesse conjunto de dados destacam-se:

- ⇒ As preparações de lipase pancreatina (LKM e LNU) foram testadas na hidrólise de lipídeos contidos no efluente de produtos lácteos em reatores de bancada, por meio de um planejamento experimental, considerando como variáveis independentes o tipo de preparação enzimática (LKM e LNU) e a concentração de cloreto de sódio, em substituição à goma arábica e como variável resposta a concentração de ácidos graxos formados. De acordo com o modelo matemático proposto, a reação de hidrólise foi maximizada (17,97 mM) para efluentes suplementados com 7 mM de NaCl e preparação enzimática LNU 0,3% (m/m), mantendo fixa a temperatura (37°C), tempo de hidrólise (6 h), ajuste de pH 8,0 com solução alcalinizante NaOH 1M e agitação magnética (200 rpm). Os valores obtidos na análise estatística indicaram que o termo quadrático (tipo de preparação enzimática) apresentou uma influência significativa na formação de ácidos graxos, enquanto a influência de agentes emulsificantes ou compostos iônicos não foi significativa para o incremento da atividade hidrolítica da lipase, facilitando, desta forma, o processo de hidrólise em escalas ampliadas e redução de custos com insumos.
- ⇒ A hidrólise do efluente empregando a lipase LNU foi otimizada por meio de um segundo planejamento fatorial e de acordo com os resultados obtidos foi possível estabelecer as condições (concentração enzimática 0,5% (m/m), ajuste de pH 8,0 com solução alcalinizante NaOH 1M e concentração de íons cálcio de 10 mM, sob agitação magnética de 200 rpm, temperatura de 37°C e por 24 h) que favorecem a maior formação de ácidos (54,36 mM).
- ⇒ A avaliação do pré-tratamento enzimático do efluente pela ação da enzima LNU por meio de testes de biodegradabilidade anaeróbia revelou um aumento na velocidade inicial de produção de metano de 59 ± 4 mL/dia (efluente bruto) para 180 ± 10 mL/dia (efluente hidrolisado).

- ⇒ A variação do tempo de hidrólise influenciou na redução de proteínas e lipídeos presentes no efluente, facilitando a remoção de matéria orgânica na etapa de biodigestão anaeróbia, alcançando valores de remoção de DQO de 81% para o efluente pré-tratado enzimaticamente e 40% para o efluente bruto. Essa elevada porcentagem de remoção de matéria orgânica foi provavelmente decorrente da assimilação dos componentes oriundos da hidrólise de lipídeos pelos microrganismos anaeróbios. O volume final de metano formado pelo efluente bruto foi inferior (209 ± 47 mL) aos obtidos em todas as amostras hidrolisadas. O pré-tratamento enzimático foi otimizado para um tempo de 12 h, possibilitando a formação de um volume de metano superior em 200% (445 ± 29 mL) em relação ao controle. Todas as amostras pré-tratadas enzimaticamente apresentaram velocidades iniciais superiores as obtidas nas amostras de efluente bruto, com eficiência de formação de metano de aproximadamente 2-3 vezes superior. As elevadas concentrações de ácidos graxos formados pela etapa de hidrólise enzimática não promoveram inibição na biodegradação pelos microrganismos anaeróbios, devido à elevada velocidade de degradação obtida nos primeiros dias. Além disso, foi testada a possibilidade de efetuar simultaneamente as etapas de hidrólise e biodigestão, revelando resultados promissores com relação à formação de biogás (354 ± 34 mL). Considerando o benefício advindo na eliminação de uma etapa no processo proposto, essa estratégia precisa ainda ser melhor explorada.
- ⇒ A lipase pancreatina comercializada pela empresa Nuclear ofereceu a melhor relação custo/benefício, perfazendo um custo de US\$ 0,33 por litro de efluente tratado e num aumento de 1,3 vezes na remoção de matéria orgânica, em termos de demanda química de oxigênio (DQO), em relação ao efluente bruto.
- ⇒ Considerando que a hidrólise de lipídeos é a etapa determinante na digestão anaeróbia, o tratamento proposto poderá auxiliar na eficiência de remoção de DQO e na redução do tempo de biodegradação nas estações de tratamento.

6. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomenda-se as seguintes etapas:

- ⇒ Caracterizar as propriedades bioquímicas e cinética de outras enzimas presentes (amilase e protease) na preparação enzimática LNU;
- ⇒ Avaliar a biodegradabilidade anaeróbia do efluente pré-tratado com menor concentração de enzima;
- ⇒ Avaliar a biodegradabilidade do efluente em regime de batelada alimentada;
- ⇒ Testar outras configurações de reatores na etapa de hidrólise dos lipídeos e proteínas (reatores de membrana);
- ⇒ Avaliar o pré-tratamento enzimático em reatores anaeróbios do tipo UASB, EGSB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. L. (2002). Produção de ácidos orgânicos por *Ceriporiopsis subvermispota* durante a biodegradação de *Pinus taeda*. VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas – VII SHEB, Maringá. Anais de Resumo, v.1, p.101.

AGUILAR, G.; MORLON-GUYOT, J.; TREJO-AGUILAR, B.; GUYOT, J. P. (2000). Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 406–413.

AITKEN, M. D. (1993). Waste applications of enzymes: Opportunities and obstacles. *The Chemical Engineering Journal*, v.52, B.49-B.58.

AKAY, G.; ERHAN, E.; KESKINLER, B.; ALGUR, O. F. (2002). Removal of phenol from wastewater using membrane-immobilized enzymes: Part II. Cross-flow filtration. *Journal of Membrane Science*, v. 206, n. 1-2, p. 61-68.

ALVES, M. M.; VIEIRA, J. A. M.; PEREIRA, R. M. A.; PEREIRA, M. A.; MOTA, M. (2001). Effect of lipids and oleic acid on biomass. Development in anaerobic fixed-bed reactors. Part I: Biofilm growth and activity. *Water Research*, v.35, n.1, p.255-263.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. (1992). Effect of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 808-812.

APHA; AWWA; WPCF. (1995). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th edition, New York.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. (1996). Bioreactors with lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416.

BARCLAY, M.; TETT, V. A.; KNOWLES, C. J. (1998). Metabolism and enzymology of cyanide/metalocyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, n. 5, p. 321-330.

BENZONANA, G.; DESNUELLE, P. (1965). Action of some effectors on hidrolisis of long-chain triglycerides by pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 164, n. 1, p. 47-&.

BEVILAQUA, J. V.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L., (2000). Utilização de tirosinase no tratamento de efluente fenólico, *Anais do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Águas de São Pedro, Brasil, 6p.

BOLETIM INFORMATIVO KIN MASTER. (2000). In: *Procedimento Operacional Padrão*, 12p.

BON, E. P. S.; PEREIRA Jr., N. (eds). (1999). *Tecnologia Enzimática*, Editado pelo Enzitec. 113p.

BORGSTRÖM, B. (1975). Interactions between pancreatic lipase and colipase and substrate, and importance of bile-salts. *Journal of Lipid Research*, v. 16, n. 6, p. 411-417.

- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.
- BRANCO, S. M.; HESS, M. L. (1975). Tratamento de resíduos. In: *Tópicos de Microbiologia Industrial*, EDUSP, v.2. pp.47-76.
- BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R. G. (1974). *Lipolytic Enzymes*. Academic Press, New York.
- BROCKMAN, H. L. (1984). General features of lypolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: *Lipases*, B. Borgstrom and H.L. Brockman, Elsevier (eds.), Amsterdam, p. 3-46.
- BRUNO, M. (1995). Multienzyme powdered composition containing bacteria for treatment of waste. *Patent N° US5464766*.
- BUCHELI-WITSCHERL, M.; EGLI, T. (2001). Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 25, n. 1, p. 69-106.
- CAIL, R. G.; BARFORD, J. P. (1985). The development in an upflow floc digester and an upflow anaerobic sludge blanket digester treating cane juice stillage. *Biotechnology Letters*, v. 7, p. 493-498.
- CAIL, R. G.; BARFORD, J. P.; LICHACZ, R. (1986). Anaerobic digestion of wool scouring wastewater in a digester operated semi-continuously for biomass retention. *Agricultural Wastes*, v.18, n.1, p.27-38.
- CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G. A.; FREIRE, D. M. G. (2001). Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. *Biotechnology Letters*, v. 23, p. 1591-1595.
- CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L.; RUSSO, C.; FREIRE, D. D. C.; CASTILHO, L. R. (2002). Processo de preparação e composição de preparado enzimático para tratamento de efluentes domésticos e industriais com elevado teor de gorduras, proteínas e/ou carboidratos e processo para tratamento de efluentes domésticos e industriais com elevado teor de gorduras, proteínas e/ou carboidratos. *Patente N° PI0007101-3A*.
- CANOVAS-DIAZ, M.; SANCHEZ-ROIG, M. J.; IBORRA, J. L. (1991) Myristic and oleic acid degradation by an acclimated anaerobic consortia: synergistic behaviour. In: *Biomass for Energy, Industry and Environment. 6th E.C. Conference*, eds G. Grassi, A. Collina e H. Zibetta, p. 580-584. Elsevier Applied Science, London.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. (1995). Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova*, v. 16, p. 544-554.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A A; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156.
- CAZA, N.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; TAYLOR, K. E. (1999). Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Research*, v. 33, n. 13, p. 3012-3018.

- CHAGAS, E. P.; DURRANT, A. R. (2001). Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 8-9, p. 473-477.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. (1997). Bioquímica ilustrada, 2^o ed. *Artes Médicas*, Porto Alegre. p. 53-92 e p. 177-192.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. (1947). A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*, v. 171, n. 2, p. 501-505.
- CHARTRAIN, M.; KATZ, L.; MARCIN, C.; THIEN, M.; SMITH, S.; FISHER, F.; GOKLEN, K.; SALMON, P.; BRIX, T.; PRICE, K.; GREASHAM, R. (1993). Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 575-580.
- CHEN, B. Y. (2002). Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 3, p. 437-446.
- COKS, L. V.; VAN REDE, C. (1966). In: *Laboratory handbook for oils and fats analysis*, 1st ed., Academy Press, London.
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K. (1980). In: *Introdução à Bioquímica*, 4^o ed. Editora Edgard Bluncher Ltda, 525p.
- COOKSON Jr., J. T. (1995). *Bioremediation Engineering - Design and Application*. McGraw-Hill Inc., EUA. 524p.
- COSTA, S. A. (2002). Catalase para remoção de peróxido de hidrogênio dos banhos de branqueamento. *Tese de Doutorado*, Departamento de Engenharia Têxtil, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal, 134p.
- CZERSKA, B.; MIKSCH, B.; MATSCHÉ, K.; FRANZ, A. N. (1997). Application of enzymatic activity measurements to biological phosphate removal from wastewater. *Water Science and Technology*, v. 36, n. 10, p. 87-95.
- D'ANNIBALE, A.; STAZI, S. R.; VINCIGUERRA, V.; DI MATTIA, E.; SERMANI, G. G. (2000). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 6-7, p. 697-706.
- DE FELICE, B.; PONTECORVO, G.; CARFAGNA, M. (1997). Degradation of waste water from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnology*, v.17, n.3, p.231-239.
- DE LA RUBIA, T.; LINARES, A.; PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; ROMERA, J.; MARTÍNEZ, J. (2002). Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Research in Microbiology*, v. 153, n.8, p.547-554.
- DHARMISTHITI, S. KUHASUNTISOOK, B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP₆₀₂: Biochemical properties and application for wastewater treatment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.21, p.587-593.

- DUEHOLM, T. E.; ANDREASEN, K. H.; NIELSEN, P. H. (2001). Transformation of lipids in activated sludge. *Water Science and Technology*, v. 43, n. 1, p. 165-172.
- EDWARDS, W.; LEUKES, W. D.; BEZUIDENHOUT, J. J. (2003). Ultrafiltration of petrochemical industrial wastewater using immobilised manganese peroxidase and laccase: application in the defouling of polysulphone membranes. *Desalination*, v. 149, n. 1-3, p. 275-278.
- EGLI, T. (2001). Biodegradation of metal-complexing aminopolycarboxylic acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 92, n. 2, p. 89-97.
- ENTRESSANGLES, B.; DESNUELLE, P. (1968). Action of pancreatic lipase on aggregated glyceride molecules in an isotropic system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 159, p. 285-295.
- ERDMANN, H.; VORDERWERLBECKE, T.; SCHMID, R.; KIESLICH, K. (1990). In: Lipases: structure, mechanism and genetic engineering, edited by L. Alberghing, R.D. Schmid and R. Verger, GBF. *Monographs, Braunschweig Germany*, v. 16, p. 425-428.
- EZZI, M. I.; LYNCH, J. M. (2002). Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 7, p. 1042-1047.
- FABER, K. (ed.) (1997). *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, 3rd Edition, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, Cap. 1,2 e 3. 402p.
- FENICE, M.; SERMANI, G. G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. (2003). Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*, v. 100, n. 1, p. 77-85.
- FORSTER, C. F. (1992). Oils, fats and greases in wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, v.55, p.402-404.
- GAN, Q.; BAYKARA, F.; RAHMAT, H.; WEATHERLEY, L. R. (2000). Analysis of a direct contact membrane reactor for lipase catalysed oil hydrolysis in a dynamic emulsion system. *Catalysis Today*, v. 56, p. 179-190.
- GARDON, R.; LEBESGUE, Y.; BALD, J-L. (1991). Process and apparatus for the application of selected strains, applied to the treatment of fats and starches. *Patent N° FR2684664*.
- GAVALA, H. N.; KOPSINIS, H.; SKIADAS, I. V.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. (1999). Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Agricultural Engineering Research*, v.73, p.59-63.
- GANDHI, N. N. (1997). Applications of lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.74, n.6, p.621-634.
- GARDON, R.; LEBESGUE, Y.; BALD, J-L. (1991). Process and apparatus for the application of selected strains, applied to the treatment of fats and starches. *Patent N° FR2684664*.
- GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. (1995). Environmental applications. In: *Microbial Biotechnology*. Eds. W.H. Freeman & Co. N. York. pp. 561-620.
- GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 513-518.

- GROSS, R. (1996). Hidrólise enzimática de gorduras de origem animal. *Dissertação de Mestrado*, UFSC, Florianópolis, SC, 63p.
- HANAKI, K.; MATSUO, T.; NAGASE, M. (1981). Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, p.1591-1610.
- HARALDSSON, G. G. (1991). The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. *Marine Lipids Biotechnology*, cap. 7, p. 337-352.
- HARPER, W. I. (1974). In-plant control of dairy wastes. *Food Technology*, v. 28, n. 6, p. 50-52.
- HAWKES, F. R.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G. K. (1995). Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. *Water Research*, v. 29, n. 2, p.525-533.
- HAYATSU, M.; MIZUTANI, A.; HASHIMOTO, M.; SATO, K.; HAYANO, K. (2001). Purification and characterization of carbaryl hydrolase from *Arthrobacter* sp. RC100. *FEMS Microbiology Letters*, v. 201, n. 1, p. 99-103.
- HENZE, M. (1992). Characterization of wastewater for modelling of activated sludge process. *Water Science and Technology*, v. 25, n. 6, p. 1-15.
- HWU, C. S.; TSENG, S. K.; YUAN, C. Y.; KULIK, Z.; LETTINGA, G. (1998). Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Research*, v.32, n. 5, p.1571-1579.
- ISOLDI, L. A.; KOETZ, P. R.; FARIA, O. L. V.; ISOLDI, L. A. (2001). Parâmetros de operação do reator UASB em um sistema combinado reator UASB-reator aeróbio. *Revista Eletrônica do Mestrado em Engenharia Ambiental*, v. 6, p. 16-30.
- JAEGER, K.E; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVELM, M. O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, v.15, p. 29-63.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v.16, n.9, p.396-403.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, v. 53, p. 315-351.
- JOLIVALT, C.; BRENON, S.; CAMINADE, E.; MOUGIN, C.; PONTIÉ, M. (2000). Immobilization of laccase from *Trametes versicolor* on a modified PVDF microfiltration membrane: characterization of the grafted support and application in removing a phenylurea pesticide in wastewater. (2000). *Journal of Membrane Science*, v. 180, n. 1, p. 103-113.
- JUNG, J.; XING, X.-H.; MATSUMOTO, K. (2002, a). Recoverability of protease released from disrupted excess sludge and its potential application to enhanced hydrolysis of proteins in wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v. 10, n. 1, p. 67-72.
- JUNG, F. B.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. (2002, b). Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. *Biotechnology Letters*, v. 24, n. 21, p. 1797-1802.
- KAHRAMAN, S. S.; GURDAL, I. H. (2002). Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*, v. 82, n. 3, p. 215-217.

- KAO, C. M.; LIU, J. K.; LOU, H. R.; LIN, C. S.; CHEN, S. C. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*, v. 50, n. 8, p. 1055-1060.
- KARAM, J.; NICELL, J. A. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment, *Journal of Chemical and Technology Biotechnology*, v. 69, p.141-153.
- KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. (1998). *Biotransformation with lipases*, In: Rehm HJ, Pihler G., Stadler A., Kelly P.J.W. (eds). New York, v. 8, p. 37-192.
- KOETZ, P. R.; FARIA, O. L. V.; NUNES, W. A. (1996). Tratamento de efluentes da indústria de arroz parboilizado por digestão anaeróbia em reatores de fluxo ascendente. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 2, n. 2, p.117-120.
- KOMATSU, T.; HANAOKI, K.; MATSUO, T. (1991). Prevention of lipid inhibition in anaerobic process by introducing a two-phase system. *Water Science and Technology*, v. 23, p.1189-1200.
- KOSTER, I. W. (1987). Abatement of long-chain fatty acid inhibition of methanogenesis by calcium addition. *Biological Wastes*, v. 22, p. 295-301.
- KOSTER, I. W.; CRAMER, A. (1987). Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 403-409.
- KUGELMAN, I. J.; McCARTY, P. L. (1965). Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. *Journal of Water Pollution Control Federation*, v. 37, n. 1, p. 97-116.
- LALMAN, J. A.; BAGLEY, D. M. (2000). Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. *Water Research*, v. 34, n. 17, p. 4220-4228.
- LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA Jr., G. L. (2002). Hidrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.19, n.2, p.175-180.
- LEMA, J. M.; MÉNDEZ, R.; IZA, J. FERNANDEZPOLANCO, F. (1991). Chemical reactor engineering concepts in design and operation of anaerobic treatment processes. *Water Science and Technology*, v. 24, n. 8, p.79-86.
- LEHNINGER, A. L. (1976). *Bioquímica*, 2^o ed. Edgard Blücher LTDA, São Paulo: p. 67-86.
- LIE, E.; MOLIN, G. (1991). Conversion of low grade fats by biological means. In: Martin, A. M. (Ed.) *Bioconversion of waste materials to industrial products*. Elsevier Applied Science, New York, 401-416.
- LIN, S. F.; CHIOU, C. M.; YEH, C.; TSAI, Y. C. (1996). Purification and partial characterization of an alkaline lipase *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied Environmental and Microbiology*, v. 62, p. 1093-1095.
- LIN, J.- G.; CHANG, C.- N.; CHANG, S.- C. (1997). Enhancement of anaerobic digestion of waste activated sludge by alkaline solubilization. *Bioresource Technology*, v. 62, p. 85-90.
- LIU, Y.; XU, H. L.; YANG, S. F.; TAY, J. H. (2003). Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research*, v.37, p.661-673.

- LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; PASCARIELLO, M. F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T. (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, n. 3, p. 324-330.
- LÓPEZ, C.; MIELGO, I.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. (2002). Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds application to dye decolourisation. *Journal of Biotechnology*, v. 99, n. 3, p. 249-257.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, n.1, p.265-275.
- LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. J. (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 53, p. 470-472.
- LYBERATOS, G., GAVALA, H. N.; STAMATELATOU, A. (1997). An integrated approach for management of agricultural industries wastewater. *Nonlinear Analysis, Theory, Methods & Applications*, v. 30, n. 4, p. 2341-2351.
- MACEDO, G. A. (1995). Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação de lipase de *Geotrichum* sp. *Dissertação de Mestrado*, UNICAMP, Campinas, SP.
- MACHADO, R. M. G.; SIVA, P. C.; CASSEB, M. M. S.; FREIRE, V.H. (1999). Sistemas de tratamento utilizados para efluentes líquidos de laticínios. *20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, ABES. p. 375-385.
- MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. (1985). Present and future applications of lipases, Review. *Biotechnology and Genetic Engineering*, v. 3, n. 9, p. 193-217.
- MAHMOUD, N.; ZEEMAN, G.; GIJZEN, H.; LETTINGA, G. (2003). Solids removal in upflow anaerobic reactors, a review. *Bioresource Technology*, v. 90, p. 1-9.
- MALINA, J. F. B. (1992). Design of biological wastewater systems. *Seminários de Transferência de Tecnologia – Tratamento de Esgotos*. Water Environment Federation, ABES.
- MAR, L. H. B.; MARIUS, V. T. (1996). Defatting starch containing waste products. *Patent N° WO9609772*.
- MARSHALL, K. R.; HARPER, W. J. (1984). The treatment of wastes from dairy industry. In: Barnes, D.,1, *Food and allied industries*, London: The Pitman Press, Bath, v. 1, cap.5, p. 296-376.
- MARTELLI, H. L.; PANEK, A. D. (1968). Dosagem de glicídeos redutores pelo ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Bioquímica Experimental*, Rio de Janeiro: Ao livro Técnico S. A., 112p.
- MASSE, L.; KENNED, K. J.; CHOU, S. (2001). Testing of alkaline and enzymatic pretreatment for fat particles in slaughterhouses wastewater. *Bioresource Technology*, v. 77, n. 2, p.145-155.
- MASSE, L.; MASSÉ, D. I.; KENNED, K. J. (2003). Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 9, p.1365-1372.

- MÁXIMO, C.; AMORIMAND, M. T. P.; COSTA-FERREIRA, M. (2003). Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, n. 1, p. 145-151.
- MCCARTHY, P. (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals. Part three: toxic materials and their control. *Public Works*, p. 91-94.
- MCCARTY, P. L. (1982). One hundred years of anaerobic treatment. In: International Symposium on Anaerobic Digestion, 2, Travemünde. Proceedings, Amsterdam: *Elsevier Biomedical Press* b.v., p. 3-22.
- MENDES, A. A.; FREITAS, L.; CASTRO, H. F. Biodegradabilidade anaeróbia de lipídeos e proteínas presentes em efluentes das indústrias de laticínios empregando enzimas hidrolíticas. In: *VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - VI ENZITEC*, Livro de Resumos, v. 1, p. 229.
- MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMISTHITI, S. (2002). Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 50, p. 101-105.
- MORETTO, E.; FETT, R. (1998). *Óleos e Gorduras Vegetais (Processamento e Análises)*. 2ªed, Editora da UFSC, Florianópolis.
- MOUNEIMNE, A. H.; CARRÈRE, H.; BERNET, N.; DELGENÈS, J. P. (2003). Effect of saponification on the anaerobic digestion of solid fatty residues. *Bioresource Technology*, v. 90, p. 89-94.
- MOZAFFAR, Z.; WEETE, J. D.; DUTE, R. (1994). Influence of surfactants on an extracellular lipase from *Pythium-ultimum*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 71, n. 1, p. 75-79.
- NAGARATHNAMMA, R. BAJPAI, P. BAJPAI, P. K. Studies on decolorization and detoxification of chlorinated lignin compounds in kraft bleaching effluents by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 939-948.
- NASSER, A. M.; GLOZMAN, R.; NITZAN, Y. (2002). Contribution of microbial activity to virus reduction in saturated soil. *Water Research*, v. 36, n. 10, p. 2589-2595.
- NIEMAN, C. (1954). Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological Reviews*, v. 18, p. 147-163.
- NIGAM, P.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; SINGH, D. (1998). Degradation of naphthalene by bacterial cultures. *Environmental International*, v. 24, n. 5-6, p. 671-677.
- NOVAES, R. F. (1986). Microbiology of anaerobic digestion. In: Seminário Internacional sobre Tratamento Anaeróbico em Países Tropicais. *IAWPRC-ABES*. São Paulo.
- NOVAK, J. T.; CARLSON, D. (1970). The kinetics of anaerobic long chain fatty acid degradation. *Journal Water Pollution Control Federation*, v. 42, p. 1932-1943.
- NOVOZYMES. (2000). Enzimas removem depósitos em máquinas de papel. *Catálogo Informativo*.

- OMIL, F.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. (1995). Anaerobic treatment of saline wastewater under high sulphide and ammonia content. *Bioresource Technology*, v. 54, p. 269-278.
- PAAR, A.; COSTA, S.; TZANOV, T.; GUDELJ, M.; ROBRA, K.- H.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. M. (2001). Thermo-alkali-stable catalases from newly isolated *Bacillus* sp. for the treatment and recycling of textile bleaching effluents. *Journal of Biotechnology*, v. 89, n. 2-3, p. 147-153.
- PAT, A. M. (1995). Method of separating oily materials from wash water. *Patente N° US 5,459,066*.
- PAVLOSTHATIS, S. G.; GIRALDO-GOMEZ, E. (1991). Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Control*, v. 21, p. 411-490.
- PELED, N.; KRENZ, M. C. (1981). A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol. *Analytical Biochemistry*, v. 112, n. 2, p. 219-222.
- PENAUD, V., DELGENÈS, J. P., TORRIJOS, M., MOLETTA, R., VANHOUTTE, B., CANS, P. (1997). Definition of optimal conditions for the hydrolysis and acidogenesis of a pharmaceutical microbial biomass. *Process Biochemistry*, v. 32, n. 6, p. 515-521.
- PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F.; FURIGO Jr, A. (2003). Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola empregando lipase de *Candida rugosa*. In: *XIV Simpósio Nacional de Fermentações-SINAFERM*, CD-ROOM, Florianópolis-SC.
- PEREIRA, E. B. (2004). Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas. *Tese de Doutorado*, UFSC, Florianópolis, SC.
- PERLE, M.; KIMCHIE, S.; SHELEF, G. (1995). Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Water Research*, v. 29, n. 6, p.1549-1554.
- PETRUY, R.; LETTINGA, G. (1997). Digestion of a milk-fat emulsion. *Bioresource Technology*, v. 61, p. 141-149.
- PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. (2002). Lipase-catalyzed production biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 1077-1082.
- QUÉMÉNUER, M.; MARTY, Y. (1994). Fatty acids and sterols in domestic wastewater. *Water Research*, v.28, p.1217-1226.
- RAUNKJAER, K.; HVITVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. H. (1994). Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Research*, v.8, p.251-262.
- RINZEMA, A.; BOONE, M.; VAN KNIPPENBERG, K.; LETTINGA, G. (1994). Bactericidal effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion. *Water Environment Research*, v. 66, n. 1, p. 40-49.
- ROBLES, A.; LUCAS, R.; DE CIENFUEGOS, R.; GÁLVEZ, A. (2000). Biomass production and detoxification of wastewater from the olive industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 217-221.

- ROBLES, A.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; OMAR, N. B.; PÉREZ, R.; GÁLVEZ, A. (2002). Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH32. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 4, p. 516-522.
- ROCHA, J. M. S. (1999). Aplicações de agentes tensoactivos em biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia*, n. 64, p. 5-11.
- ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. (2001). The effect of reaction condition upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochemistry*, v.36, p. 947-953.
- ROY, F.; ALBAGNAC, G.; SAMAIN, E. (1985). Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophics cultures degrading long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p. 702-705.
- RUIZ, J. C.; DE LA RUBIA, T.; PÉREZ, J.; LOPEZ, J. M. (2002). Effect of olive oil mill wastewater on extracellular ligninolytic enzymes produced by *Phanerochaete flavidio-alba*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 212, n. 1, p. 41-45.
- RUSTON, B. (1993). Chemical pretreatment of dairy wastewater. *Water Science and Technology*, v. 28, n. 2, p. 67-72.
- SALMINEN, E.; RINTALA, J. (2002). Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste - a review. *Bioresource Technology*, v.83, p. 13-26.
- SÄRNER, E. (1981). Removal of dissolved and particule organic matter in high-rate trickling filters. *Water Research*, v. 15, p. 671-678.
- SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. (2000). Characterization of turkey pancreatic lipase. *Biochimie*, v. 82, n. 2, p. 153-159
- SAYED, S.; VAN DER ZANDEN, J.; WIJFFELS, R.; LETTINGA, G. (1988). Anaerobic degradation of the various fractions of slaughterhouse wastewater. *Biological Wastes*, v. 23, n. 2, p. 117-142.
- SCHMIDT, J. E.; AHRING, B. K. (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 229-246.
- SCIOLI, C.; VOLLARO, L. (1997). The use of *Yarrowia lipilytica* to reduce pollution in olive mill wastewater. *Water Research*, v. 31, n.10, p.2520-2524.
- SEETHARAM, G. B.; SAVILLE, A. B. (2003). Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Research*, v. 37, n. 2, p. 436-440.
- SEITZ, E. W. (1974). Industrial applications of microbial lipases – a review. *Journal of the American Oils's Chemists Society*, v. 51, p. 12-16.
- SHAHANI, K. M. (1975). Lipases and Esterases, In: REED, Gerald (Ed), *Enzymes in Food Processing*, 2° ed., New York: Academic Press, p. 182-214.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662.

- SHARON, C.; FURUGOH, S.; YAMAKIDO, T.; OGAWA, H.; KATO, Y. (1998). Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 304-307.
- SILVA, D. J.; MODOLO, M. R.; VARESCHE, M. B.; BLUNDI, C. E.; ZAIAT, M. (2002). Treatment of lipid-rich wastewater in integrated enzymatic-anaerobic reactors. In: *VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas-VII SHEB*, Anais de Resumo, v. 1, p. 13, Maringá-PR.
- SIVALINGAM, G.; CHATTOPADHYAY, S.; MADRAS, G. (2003). Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone), poly (vinyl acetate) and their blends by lipases. *Chemical Engineering Science*, v. 58, n. 13, p.2911-2919.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F. (1999). Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77/79, p. 745-57.
- SOUBLES, M.; MUXÍ, L.; FERNÁNDEZ, A.; TARLERA, S.; QUIROLO, M. (1994). Inhibition of methanogenesis from acetate by Cr⁺³ and ammonia. *Biotechnology Letters*, v. 16, n. 2, p. 195-200.
- SOUZA, M. E. (1986) - Criteria for utilization design and operation of UASB reactors. In: *Seminário Internacional sobre Tratamento Anaeróbico em Países Tropicais. IAWPRC-ABES*. São Paulo.
- STAUFFERT, D. (2000). Hidrólise enzimática do óleo de pescado. *Dissertação de Mestrado*, FURG, Rio Grande, RS, 120p.
- STRYDOM, J. P.; BRITZ, T. J.; MOSTERT, J. F. (1997). Two-phase anaerobic digestion of three different dairy effluents using a hybrid bioreactor. *Water SA*, v. 23, n. 2, p. 151-155.
- TEIXEIRA, G. A. (2001). Tratamento seqüencial de efluentes da indústria de laticínios: Hidrólise de gorduras e tratamento biológico. *Dissertação de Mestrado*, COOPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 106p.
- TISS, A.; CARRIÉRI, F.; DOUCHET, I.; PATKAR, S.; SVENDSEN A.; VERGER, R. (2002). Interfacial binding and activity of lipases at the lipid-water interface: Effects of gum arabic and surface pressure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 26, p. 135-145.
- TORRES, C. F.; NETTEKOVEN, T. J.; HILL JR., C. G. (2003). Preparation of purified acylglycerols of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their reesterification with conjugated linoleic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 49-58.
- TSCHOCKE, C. (1990). Process for the biological degradation of fatty matter present in sewage. *Patent N° FR2659645*.
- UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymatic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochemistry*, v.36, n. 10, p. 933-939.
- VAZOLLER, R. F; GARCIA, M. A. R.; GARCIA, A. D.; CONCEIÇÃO NETO, J. (1989). Manual Técnico sobre Microbiologia de Lodos Ativados. *CETESB - Séries Anuais*, 22p.

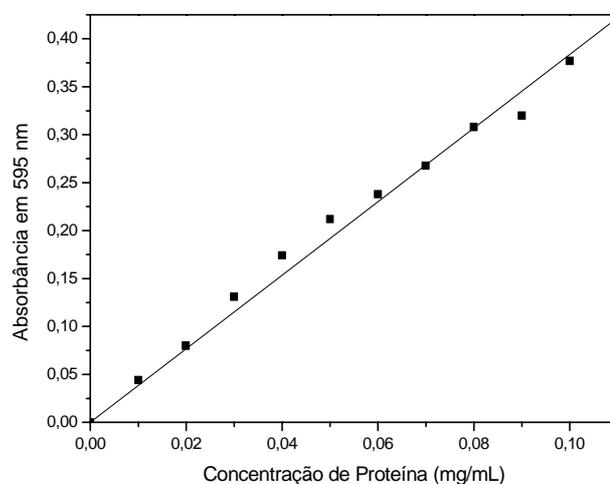
- VEERARAGAVAN, K. (1990). A simple and sensitive method for the estimation of microbial lipase activity. *Analytical Biochemistry*, v. 186, p. 301-305.
- VERGER, R. (1997). Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, v.15, p. 32-38.
- VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MÉNDEZ, R.; LEMA, J. M. (2000). Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewater. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 231-239.
- VIRTO, M.; CHÁVARRI, F.; BUSTAMANTE, M. A.; BARRON, L. J. R.; ARAMBURU, M.; VICENTE, M. S.; PÉREZ-ELORTONDO, J.; ALBISU, M.; DE RENOBALLES, M. (2003). Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour. *International Dairy Journal*, v. 13, n. 5, p. 391-399.
- VOGEL, A. I. (1981). *Análise Inorgânica Quantitativa*, 4^o ed, v. 1, Rio de Janeiro: Guanabara Dois, cap. 18, p. 514-574.
- VON SPERLING, M. (1998). Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*, v. 1, 2^o ed, Belo Horizonte: DESA/UFMG, 169-170.
- VULFSON, E.N. (1994). Industrial applications of lipases In: Woolley, P.; Petersen, S.B. (eds).; *Lipase: Their Structure, Biochemistry and Application*, Cambridge University Press, Great Britain, p. 271-288.
- WALDE, P. (1990). A colorimetric determination of fatty acids as a new assay of lipases in reverse micelles. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 67, n. 2, p. 110-115.
- WAKELIN, N. G.; FORSTER, C. F. (1997). An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. *Bioresource Technology*, v. 59, p. 37-43.
- WENDT, M. R.; KOETZ, P. R.; ABIB, E. N. (1999). Biodegradabilidade anaeróbia de águas residuárias da suinocultura. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 5, n. 2, p. 161-163.
- WENG, C. -N.; JERIS, J. S. (1976). Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. *Water Research*, v. 10, p. 9-18.
- WHISTLER, R. L. (1993). *Industrial Gums*, Academic Press, New York, p.309.
- XIA, J.; CHEN, X.; NNANNA, I. A. (1996). Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 73, n. 1, p.115-120.
- YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.438-450.
- YU, H. Q.; TAY, J. H.; FANG, H. P. F. (2001). The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Research*, v. 35, n. 4, p. 1052-1060.
- ZHU, K.; JUTILA, A; TUOMINEN, E. K. J.; PTKAR, S. A; SVENDSEN, A; KINNUNEN, P. K. (2001). Impact of the tryptophan residues of *Humicola lanuginosa* lipase on its thermal stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1547, p. 329-338.

8. APÊNDICES

Apêndice 8.1: Curvas padrão para a quantificação de compostos por espectrofotometria

A-Curva padrão de proteína pelo método de Bradford (1976), empregando como padrão a albumina sérica bovina (BSA)

Tubo n°	Conc. Proteína (mg/mL)	Abs. (1)	Abs. (2)	Abs. (3)	Abs. (média)
1	0,00	0	0	0	0
2	0,01	0,033	0,054	0,046	0,044
3	0,02	0,074	0,08	0,068	0,080
4	0,03	0,14	0,131	0,131	0,131
5	0,04	0,173	0,164	0,174	0,174
6	0,05	0,211	0,21	0,214	0,212
7	0,06	0,223	0,247	0,244	0,238
8	0,07	0,242	0,277	0,284	0,268
9	0,08	0,308	0,311	0,299	0,308
10	0,09	0,307	0,32	0,32	0,320
11	0,1	0,354	0,377	0,341	0,377

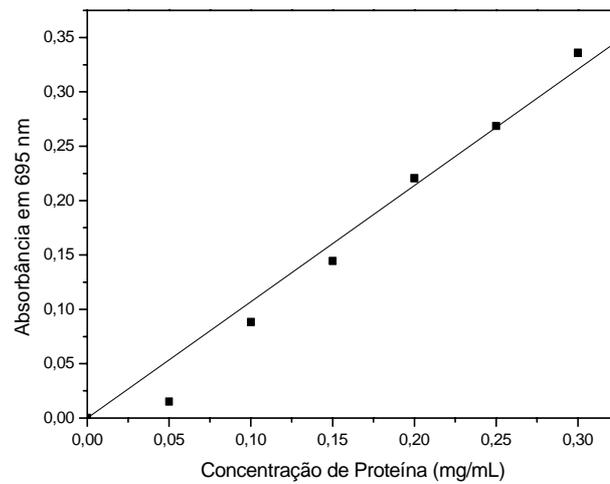


A equação de ajuste para o cálculo do teor de proteína é:

$$\text{Abs} = 3,8362 \text{ Cp (mg/mL)}, R^2 = 0,9955.$$

B-Curva padrão de proteína pelo método de Lowry (1951), empregando como padrão a albumina sérica bovina (BSA)

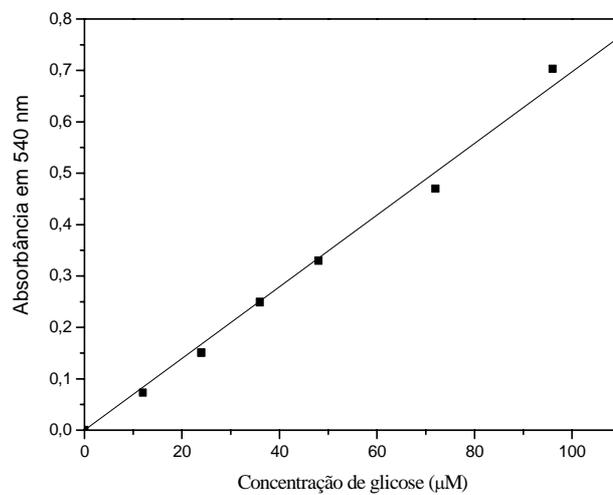
Tubo n°	Conc. Proteína (mg/mL)	Abs. (1)	Abs. (2)	Abs. (média)
1	0,00	0	0	0
2	0,05	0,0165	0,0134	0,0149
3	0,10	0,0978	0,0790	0,0884
4	0,15	0,1543	0,1345	0,1444
5	0,20	0,2234	0,2178	0,2206
6	0,25	0,2720	0,2652	0,2686
7	0,30	0,3438	0,3278	0,3358



A equação de ajuste para o cálculo do teor de proteína é:
 $Abs = -0,02322 + 1,17645 * C_p \text{ (mg/mL)}$, $R^2 = 0,99388$.

C-Curva padrão de açúcares redutores pelo método do DNS, empregando glicose como padrão

Tubo n°	Conc. Glicose (µg/mL)	Abs. (1)	Abs. (2)	Abs. (média)
1	0	0	0	0
2	12	0,0725	0,0726	0,0726
3	24	0,1505	0,1501	0,1503
4	36	0,2490	0,2490	0,2490
5	48	0,3300	0,3297	0,3299
6	72	0,4695	0,4698	0,4696
7	96	0,7036	0,7029	0,7032



A equação de ajuste para o cálculo do teor de açúcares redutores é:

$$\text{Abs} = 0,00698 * C_p (\mu\text{g/mL}), R^2 = 0,9965.$$

Apêndice 8.2 Determinação das características bioquímicas e cinéticas das preparações de lipases

A-Influência do pH na atividade hidrolíticas das preparações de lipase

pH	Atividade hidrolítica (U/mg)		
	Lipase pancreática (LPP)	Lipase pancreatina (LKM)	Lipase pancreatina (LNU)
5,0	841 ± 127	1109 ± 227	437 ± 100
5,5	1033 ± 49	1240 ± 288	724 ± 68
6,0	1391 ± 46	2066 ± 302	987 ± 4
6,5	2591 ± 248	2532 ± 292	1300 ± 40
7,0	3574 ± 306	3357 ± 157	1772 ± 32
7,5	4029 ± 450	3686 ± 150	2278 ± 158
8,0	5286 ± 383	4606 ± 238	3992 ± 2
8,5	3505 ± 288	3762 ± 18	2428 ± 109
9,0	3379 ± 0	2942 ± 166	2200 ± 0

B-Influência da temperatura na atividade hidrolíticas das preparações de lipase

Temperatura (°C)	Atividade hidrolítica (U/mg)		
	Lipase pancreática (LPP)	Lipase pancreatina (LKM)	Lipase pancreatina (LNU)
30	3506 ± 322	2411 ± 0	2543 ± 315
37	5434 ± 256	4209 ± 159	3993 ± 3
40	5649 ± 97	4570 ± 130	3241 ± 133
45	6175 ± 133	3885 ± 59	2794 ± 70
50	3605 ± 132	3445 ± 202	2041 ± 53
55	2777 ± 156	2839 ± 433	1868 ± 66
60	1600 ± 240	1698 ± 229	1596 ± 106

C-Influência da concentração de substrato atividade hidrolíticas das preparações de lipase

Proporção Óleo/Água (% m/m)	Concentração de ácidos graxos (mM)	Atividade hidrolítica (U/mg)		
		Lipase pancreática (LPP)	Lipase pancreatina (LKM)	Lipase pancreatina (LNU)
2,5	93	-	970	931
5,0	186	2016	1459	1478
10,0	372	2246	2784	1628
20,0	744	3045	3217	2151
30,0	1116	5901	3674	2532
40,0	1488	6636	4258	3199
50,0	1860	6972	5005	3933

D-Estabilidade térmica das preparações de lipase

Lipase pancreática (LPP)

Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/mg)	
	1 h	2 h
37	5434 ± 236	5434 ± 236
40	4577 ± 21	316 ± 85
45	586 ± 57	472 ± 85
50	0	0

Lipase Pancreatina Kin Master (LKM)

Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/mg)	
	1 h	2 h
37	4209 ± 158	4209 ± 158
40	2141 ± 51	1520 ± 0
45	1862 ± 336	996 ± 336
50	692 ± 36	561 ± 15
55	560 ± 0	488 ± 16
60	277 ± 101	109 ± 11

Lipase Pancreatina Nuclear (LNU)

Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/mg)	
	1 h	2 h
37	3992 ± 3	3992 ± 3
40	1218 ± 28	948 ± 51
45	1336 ± 113	461 ± 96
50	368 ± 3	11 ± 11
55	34 ± 34	0
60	11 ± 11	0

E-Influência de íons metálicos (20 mM) na atividade hidrolítica de preparações de lipase

Íons Metálicos	Atividade Hidrolítica (U/mg)			Atividade Relativa (%)		
	LPP	LKM	LNU	LPP	LKM	LNU
Controle	1100	1002	818	100	100	100
Na ⁺	1214	1188	1003	110	118	123
NH ₄ ⁺	106	35	0	9,6	4	0
K ⁺	616	713	590	56	72	72
Ag ⁺	581	589	475	53	59	58
Ca ⁺²	1162	1285	986	106	128	120
Ba ⁺²	0	0	0	0	0	0
Cu ⁺²	0	0	0	0	0	0
Pb ⁺²	264	167	176	24	17	22
Fe ⁺²	0	0	0	0	0	0
Fe ⁺³	0	0	0	0	0	0
Al ⁺³	299	0	0	27	0	0
Bi ⁺³	0	0	0	0	0	0

Apêndice 8.3. Hidrólise Enzimática do Soro de Queijo

A-Hidrólise Enzimática do Soro de Queijo com a Lipase LKM (Kin Master)

Condições Experimentais: Temperatura 40°C e Agitação 1200 rpm

Ensaio CA: 100 g de soro de queijo, 3,00 g de goma arábica (3% m/m), ajuste de pH=8,0 (3 g NaHCO₃), 0 g de CaCl₂ e 0 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)
0	2,05	1,73	15,19
60	2,05	0,57	5,00
120	2,05	0	0

Ensaio 1A: 100 g de soro de queijo, 7,00 g de goma arábica (7% m/m), ajuste de pH=8,0 (3 g NaHCO₃), 0 g de CaCl₂ e 0 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)
0	2,05	1,68	14,75
60	2,05	0,61	5,36
120	2,05	0	0

Ensaio 2A: 100 g de soro de queijo, 7,00 g de goma arábica (7% m/m), ajuste de pH=8,0 (3 g NaHCO₃), 0 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)
0	2,05	2,04	17,91
60	2,04	2,85	25,15
120	2,05	2,26	19,84
180	2,05	1,44	12,64
240	2,05	1,08	9,48
300	2,05	0	0

Ensaio 3A: 100 g de soro de queijo, 3,00 g de goma arábica (3% m/m), sem ajuste de pH, 0 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,05	3,94	34,59	0
60	2,05	4,91	38,55	8,48
120	2,06	5,07	44,30	9,71
180	2,05	6,02	52,85	18,26
240	2,05	6,17	54,17	19,58
300	2,05	6,26	54,96	20,37
360	2,06	6,30	55,21	20,62
420	2,05	6,32	55,49	20,90
480	2,06	6,49	56,87	22,28
720	2,06	6,52	56,97	22,38
780	2,05	6,70	58,83	24,24
900	2,04	6,90	60,88	26,29
1020	2,05	7,08	62,16	27,57
1200	2,05	7,27	63,83	29,24
1320	2,04	7,34	64,76	30,17
1380	2,05	7,77	68,22	33,63
1440	2,06	7,99	69,81	35,22

Ensaio 4A: 100 g de soro de queijo, 3,00g de goma arábica (3% m/m), ajuste de pH=8,0 NaOH 1,0 M, 0 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,05	2,41	23,51	0
60	2,06	3,30	32,04	8,53
120	2,05	4,33	42,24	18,73
180	2,05	4,53	44,19	20,68
240	2,05	4,56	44,49	20,98
300	2,05	4,70	45,85	22,34
360	2,05	4,78	46,63	23,12
420	2,05	4,88	47,61	24,10
480	2,05	4,98	48,58	25,07
720	2,05	7,52	73,36	49,85
780	2,05	7,90	77,07	53,56
900	2,05	8,05	78,54	55,03
1020	2,04	8,58	84,12	60,61
1200	2,04	8,80	86,27	62,76
1320	2,05	9,02	88,00	64,49
1380	2,05	9,40	91,71	68,20
1440	2,04	9,48	92,94	69,43

Ensaio 5A: 100 g de soro de queijo, 7,00 g de goma arábica (7% m/m), sem ajuste de pH, 0 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,06	3,46	30,23	0
60	2,05	4,60	40,23	10,00
120	2,06	4,94	43,16	12,93
180	2,06	5,18	45,26	15,03
240	2,06	5,38	47,01	16,78
300	2,06	5,54	48,41	18,18
360	2,05	5,65	49,46	19,23
420	2,05	5,77	50,51	20,28
480	2,05	5,83	51,04	20,81
720	2,04	5,97	52,68	22,45
780	2,06	6,27	54,79	24,56
900	2,05	6,30	55,32	25,09
1020	2,05	6,84	60,06	29,83
1200	2,05	7,14	62,69	32,46
1320	2,05	8,26	72,38	42,15
1380	2,05	8,60	75,36	45,13
1440	2,05	8,58	75,19	44,96

Ensaio 6A: 100 g de soro de queijo, 7,00 g de goma arábica (7% m/m), pH=8,0 NaOH 1,0 M, 0 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,05	1,99	17,47	0
60	2,06	3,53	30,93	13,46
120	2,07	3,73	32,67	15,20
180	2,06	3,86	33,81	16,34
240	2,04	4,42	38,91	21,44
300	2,06	4,89	42,81	25,34
360	2,05	5,17	45,39	27,92
420	2,06	5,21	45,63	28,16
480	2,05	5,68	49,87	32,40
720	2,06	5,93	51,82	34,35
780	2,05	6,19	54,35	36,88
900	2,04	6,32	55,76	38,29
1020	2,05	7,22	63,39	45,92
1200	2,05	8,47	74,37	56,90
1380	2,05	9,01	79,11	61,64
1440	2,05	9,24	81,92	64,45

Ensaio 7A: 100 g de soro de queijo, 3,00g de goma arábica (3% m/m), sem ajuste de pH, 0,1 mM de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,04	3,08	27,18	0
60	2,04	3,95	34,86	7,68
120	2,04	4,59	40,50	13,32
180	2,05	4,91	43,25	16,07
240	2,05	5,01	44,13	16,95
300	2,05	5,08	44,74	17,56
360	2,05	5,17	45,53	18,35
420	2,06	5,61	49,29	22,11
480	2,05	5,68	49,87	22,69
720	2,05	6,69	58,74	31,56
780	2,06	6,94	60,64	33,46
900	2,05	7,23	63,48	36,30
1020	2,05	7,88	69,19	42,01
1200	2,07	8,43	73,30	46,12
1320	2,06	8,75	76,72	49,54
1380	2,05	8,90	78,28	51,10
1440	2,05	8,90	78,28	51,10

Ensaio 8A: 100 g de soro de queijo, 7,00g de goma arábica (7% m/m), ajuste de pH NaOH 1,0 M, 0,1 mM de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,05	1,93	16,95	0
60	2,06	2,93	25,73	8,78
120	2,07	3,51	30,89	13,94
180	2,06	3,76	32,94	15,99
240	2,04	4,02	35,21	18,26
300	2,06	4,38	38,36	21,41
360	2,05	4,73	41,42	24,47
420	2,06	5,15	45,11	28,16
480	2,05	5,82	50,78	33,83
720	2,05	6,14	53,91	36,96
780	2,05	6,46	56,72	39,77
900	2,05	7,00	61,46	44,51
1020	2,05	7,82	68,66	51,71
1200	2,05	8,16	71,65	54,70
1320	2,05	8,34	73,23	56,28
1380	2,05	8,73	76,95	60,00
1440	2,05	8,95	78,29	61,34

B-Hidrólise Enzimática do Soro de Queijo com a Lipase lipase LPP (Sigma)

Condições Experimentais: Temperatura 40°C e Agitação Magnética: 200 rpm

Ensaio CB: 100 g de soro de queijo, 3,00 g de goma arábica (3% m/m), ajuste de pH=8,0 (1,3 g NaHCO₃), 0 g de CaCl₂ e 0 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)
0	2,05	2,05	20,00
60	2,05	1,00	8,78
120	2,05	0,78	6,85
180	2,05	0,31	2,72
240	2,06	0	0

Ensaio 1B: 100 g de soro de queijo, 7,00 g de goma arábica (7% m/m), ajuste de pH=8,0 (1,3 g NaHCO₃), 0 g de CaCl₂ e 0 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)
0	2,05	2,05	20,00
60	2,05	1,07	10,44
120	2,05	0,71	6,93
180	2,05	0,38	3,71
240	2,06	0	0

Ensaio 2B: 100 g de soro de queijo, 7,00 g de goma arábica (7% m/m), ajuste de pH=8,0 (1,3 g NaHCO₃) e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)
0	2,05	2,01	19,61
60	2,06	2,64	25,62
120	2,05	1,62	15,80
180	2,05	1,12	10,98
240	2,05	0,87	8,49
300	2,05	0,38	3,71
360	2,05	0,30	2,93
420	2,05	0,15	1,46
480	2,05	0,00	0,00

Ensaio 3B: 100 g de soro de queijo, 3,00 g de goma arábica (3% m/m), sem ajuste de pH e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,06	3,30	32,04	0
60	2,05	3,49	34,05	2,01
120	2,06	4,86	47,18	15,14
180	2,06	5,38	52,23	20,19
240	2,05	5,49	53,56	21,52
300	2,04	5,61	55,00	22,96
360	2,04	5,85	57,35	25,31
420	2,05	6,09	59,41	27,37
480	2,05	6,21	60,58	28,54
720	2,05	6,79	66,24	34,20
780	2,05	6,92	67,51	35,47
900	2,05	7,77	75,80	43,76
1020	2,05	7,97	77,77	45,73
1200	2,06	8,43	81,84	49,80
1320	2,05	8,79	85,76	53,72
1380	2,05	9,32	90,93	58,89
1440	2,05	9,43	92,00	59,96

Ensaio 4B: 100 g de soro de queijo, 3,0g de goma arábica (3% m/m), ajuste de pH=8,0 com NaOH 1,0M, 0 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,05	2,10	20,49	0
60	2,05	3,74	36,49	16,00
120	2,05	3,92	38,24	17,75
180	2,05	4,24	41,36	20,87
240	2,06	4,42	42,91	22,42
300	2,05	4,76	46,44	25,95
360	2,05	4,88	47,61	27,12
420	2,04	4,92	48,24	27,75
480	2,05	5,33	52,00	29,51
720	2,05	6,62	64,58	44,09
780	2,05	7,30	71,22	50,73
900	2,05	7,75	75,61	55,12
1020	2,05	8,37	81,66	61,17
1200	2,05	8,59	83,80	63,31
1320	2,05	8,88	86,63	66,14
1380	2,05	9,17	89,46	68,97
1440	2,04	9,37	91,86	71,37

Ensaio 5B: 100 g de soro de queijo, 7,00 g de goma arábica (7% m/m), sem ajuste de pH, 0 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,05	3,34	32,58	0
60	2,04	3,94	38,63	6,05
120	2,05	4,20	40,97	8,39
180	2,04	4,31	42,25	9,67
240	2,05	4,70	45,85	13,27
300	2,05	5,49	53,56	20,98
360	2,04	5,64	55,29	22,71
420	2,05	5,82	56,78	24,20
480	2,05	6,07	59,22	26,64
720	2,05	6,18	60,29	27,71
780	2,06	6,23	60,78	28,20
900	2,05	6,26	61,07	28,49
1020	2,05	6,85	66,83	34,25
1200	2,05	7,19	70,15	37,57
1320	2,05	8,47	82,63	50,05
1380	2,05	8,96	87,41	54,83
1440	2,06	9,43	91,55	58,97

Ensaio 6B: 100 g de soro de queijo, 7,00 g de goma arábica (7% m/m), pH=8,0 NaOH 1,0 M, 0 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,04	1,73	16,96	0
60	2,06	3,22	31,26	14,30
120	2,06	3,89	37,77	20,81
180	2,05	3,98	38,83	21,87
240	2,06	4,31	41,84	24,88
300	2,06	4,75	46,12	29,16
360	2,05	4,93	48,10	31,14
420	2,05	5,03	49,07	32,11
480	2,05	5,38	52,49	35,53
720	2,05	5,80	56,58	39,62
780	2,05	5,96	58,15	41,19
900	2,05	6,16	60,10	43,14
1020	2,05	6,52	63,61	46,65
1200	2,05	7,23	70,54	53,58
1320	2,05	7,51	73,27	56,31
1380	2,05	8,06	78,64	61,68
1440	2,05	8,32	81,17	64,21

Ensaio 7B: 100 g de soro de queijo, 3,00g de goma arábica (3% m/m), sem ajuste de pH, 0,22 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,05	3,22	31,41	0
60	2,05	3,95	38,54	7,13
120	2,05	4,38	42,73	11,32
180	2,06	4,45	43,21	11,80
240	2,06	4,59	44,56	13,15
300	2,04	4,61	45,20	13,79
360	2,06	4,81	46,70	15,29
420	2,05	4,99	48,68	17,27
480	2,05	5,25	51,22	19,81
720	2,05	6,44	62,83	31,42
780	2,06	6,58	63,88	32,47
900	2,05	6,75	65,85	34,44
1020	2,06	7,03	68,58	37,17
1200	2,06	7,29	70,78	39,37
1320	2,05	7,84	76,49	45,08
1380	2,05	8,05	78,54	47,13
1440	2,05	8,11	78,74	47,33

Ensaio 8B: 100 g de soro de queijo, 7,00g de goma arábica (7% m/m), ajuste de pH=8,0 NaOH 1,0 M, 0,22 g de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,06	2,06	20,00	0
60	2,06	3,61	35,05	15,05
120	2,06	4,16	40,39	20,39
180	2,06	4,26	41,36	21,36
240	2,06	4,43	43,00	23,00
300	2,05	4,56	44,49	24,49
360	2,04	4,66	45,69	25,69
420	2,05	4,81	46,93	26,93
480	2,05	5,19	50,63	30,63
720	2,05	6,56	64,00	44,00
780	2,05	6,73	65,66	45,66
900	2,05	7,00	68,29	48,29
1020	2,05	7,78	75,90	55,90
1200	2,05	8,26	80,59	60,59
1320	2,05	8,49	82,83	62,83
1380	2,07	9,14	88,31	68,31
1440	2,05	9,20	89,76	69,76

Apêndice 8.4. Hidrólise enzimática do efluente de laticínios

A-Hidrólise enzimática do efluente de laticínios, na condição de maior formação de ácidos graxos obtidos para o soro de queijo

Condições Experimentais: Temperatura 40°C e Agitação magnética: 200 rpm

Ensaio 1 e 2: 100 g de efluente, 3,00g de goma arábica (3% m/m), ajuste de pH=8,0 NaOH 1,0 M e 0,30 g de enzima LKM

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00 ± 0	0,87 ± 0,01	7,66 ± 0,26	0
60	2,00 ± 0	1,92 ± 0,49	16,97 ± 4,73	9,30 ± 4,47
120	2,01 ± 0	2,25 ± 0,31	19,66 ± 3,26	12,00 ± 2,99
240	2,00 ± 0	2,43 ± 0,24	21,28 ± 3,35	13,62 ± 3,09
300	2,00 ± 0	2,52 ± 0,24	22,06 ± 2,78	14,40 ± 2,52
480	2,00 ± 0	2,79 ± 0,02	24,42 ± 0,87	16,76 ± 0,61
600	2,00 ± 0	2,74 ± 0,03	24,01 ± 0,47	16,35 ± 0,20
720	2,00 ± 0	2,81 ± 0,01	24,63 ± 0,75	16,97 ± 0,49
1440	2,00 ± 0	2,93 ± 0,01	25,53 ± 0,93	17,87 ± 0,67

Ensaio 3 e 4: 100 g de efluente, 3,00g de goma arábica (3% m/m), ajuste de pH=8,0 NaOH 1,0 M e 0,30 g de enzima LNU

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00 ± 0	0,33 ± 0,07	3,25 ± 0,55	0
60	2,01 ± 0	1,50 ± 0,20	14,51 ± 1,59	11,26 ± 1,04
120	2,01 ± 0	1,71 ± 0,15	16,55 ± 1,03	13,30 ± 0,48
240	2,00 ± 0	1,88 ± 0,22	18,30 ± 1,70	15,05 ± 1,15
300	2,00 ± 0	1,98 ± 0,20	19,26 ± 1,45	16,01 ± 0,90
480	2,01 ± 0	2,43 ± 0,02	23,57 ± 0,53	20,32 ± 1,08
600	2,00 ± 0	2,68 ± 0,03	26,07 ± 0,43	22,82 ± 0,98
720	2,00 ± 0	3,44 ± 0,23	33,60 ± 3,10	30,35 ± 3,65
1440	2,00 ± 0	4,26 ± 0,07	41,52 ± 0,38	38,26 ± 0,94

B-Hidrólise de acordo com o Planejamento Fatorial 2²

Condições Experimentais: Temperatura 37 e 40°C, Agitação Magnética 200 rpm, Ajuste de pH com solução alcalinizante NaOH 1M.

Ensaio 1: 100 g de efluente, 0,30 g de enzima LKM e 0 mM de NaCl

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00	0,40	3,40	0
60	2,01	1,85	15,65	12,25
120	2,01	1,99	16,83	13,43
180	2,05	2,22	18,41	15,01
240	2,00	2,21	18,80	15,40
300	2,01	2,22	18,78	15,38
360	2,01	2,25	19,03	15,63

Ensaio 2: 100 g de efluente, 0,30 g de enzima LKM e 7,0 mM de NaCl

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,02	0,41	3,41	0
60	2,00	1,84	15,64	12,23
120	2,02	2,10	17,67	14,26
180	2,00	2,20	18,70	15,29
240	2,00	2,30	19,55	16,14
300	2,02	2,38	20,03	16,62
360	2,00	2,42	20,56	17,15

Ensaio 3: 100 g de efluente, 0,30 g de enzima LKM e 3,50 mM de NaCl

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00	0,40	3,40	0
60	2,00	1,70	14,45	11,05
120	2,00	2,07	17,60	14,2
180	2,01	2,12	17,93	14,53
240	2,02	2,36	19,86	16,46
300	2,00	2,41	20,49	17,09
360	2,01	2,43	20,55	17,15

Ensaio 4: 100 g de efluente, 0,30 g de enzima LNU e 7,00 mM de NaCl

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,02	0,34	2,86	0
60	2,00	1,53	13,00	10,14
120	2,00	1,69	14,37	11,51
180	2,00	1,90	16,15	13,29
240	2,00	2,03	17,26	14,40
300	2,00	2,28	19,38	16,52
360	2,00	2,45	20,83	17,97

Ensaio 5: 100 g de efluente, 0,30 g de enzima LNU e 0 mM de NaCl

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00	0,32	2,72	0
60	2,01	1,50	12,69	9,97
120	2,00	1,77	15,05	12,33
180	2,00	1,89	16,07	13,35
240	2,00	1,99	16,91	14,19
300	2,00	2,19	18,61	15,89
360	2,00	2,18	18,53	15,81

Ensaio 6: 100 g de efluente, 0,30 g de enzima LNU e 3,50 mM de NaCl

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00	0,36	3,06	0
60	2,00	1,50	12,75	9,69
120	2,00	1,73	14,70	11,64
180	2,00	1,87	15,89	12,83
240	2,00	1,94	16,49	13,43
300	2,00	2,12	18,02	14,96
360	2,00	2,38	20,23	17,17

C-Hidrólise Enzimática do Efluente empregando a lipase selecionada LNU

Condições Experimentais: Temperatura 37° C, Agitação magnética: 200 rpm.

Ensaio 1: 100 g de efluente, ajuste de pH=8,0 com NaHCO₃ 1,0 M, 0 mM de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,01	0,28	2,92	0
60	2,00	1,98	20,79	17,87
120	2,00	2,26	23,73	20,81
180	2,00	2,47	25,94	23,02
240	2,03	2,24	23,17	20,25
300	2,00	2,20	23,10	20,18
360	2,00	2,20	23,10	20,18
480	2,01	2,17	22,67	19,75
720	2,00	2,14	22,47	19,55
900	2,02	2,07	21,52	18,60
1080	2,00	2,11	22,15	19,23
1200	2,01	2,10	21,94	19,02
1440	2,00	2,11	22,15	19,23

Ensaio 2: 100 g de efluente, ajuste de pH=8,0 com NaHCO₃ 1,0 M, 0 mM de CaCl₂ e 0,50 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,01	0,27	2,92	0
60	2,01	2,64	27,58	24,66
120	2,00	3,11	32,66	29,74
180	2,00	3,21	33,71	30,79
240	2,04	3,17	32,63	29,71
300	2,00	3,28	34,44	31,52
360	2,00	3,41	35,81	32,89
480	2,01	3,66	38,24	35,32
720	2,00	3,81	40,00	37,08
900	2,01	4,08	42,63	39,71
1080	2,00	4,17	43,79	40,87
1200	2,00	4,20	44,10	41,18
1440	2,00	4,20	44,10	41,18

Ensaio 3: 100 g de efluente, ajuste de pH=8,0 com NaOH 1,0 M, 0 mM de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00	0,40	3,60	0
60	2,04	2,25	19,85	16,25
120	2,03	2,66	23,57	19,97
180	2,00	2,72	24,48	20,88
240	1,99	2,85	25,78	22,18
300	1,99	2,92	26,41	22,81
360	2,00	3,00	27,00	23,4
480	2,01	3,13	28,03	24,43
720	2,00	3,31	29,79	26,19
900	2,01	3,44	30,81	27,21
1080	2,00	3,59	32,31	28,71
1200	2,00	3,64	32,76	29,16
1440	2,03	3,86	34,23	30,63

Ensaio 4: 100 g de efluente, ajuste de pH=8,0 com NaOH 1,0 M, 10 mM de CaCl₂ e 0,50 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00	0,62	5,58	0
60	2,00	3,65	32,85	27,27
120	2,00	4,05	36,45	30,87
180	2,00	4,31	38,79	33,21
240	2,05	4,40	38,63	33,05
300	2,00	4,80	43,20	37,62
360	2,01	4,91	43,97	38,39
480	2,00	5,11	45,99	40,41
720	2,01	5,47	48,99	43,41
900	2,01	5,73	51,31	45,73
1080	2,02	6,11	54,41	48,83
1200	2,12	6,43	54,59	49,01
1440	2,00	6,66	59,94	54,36

Ensaio 5: 100 g de efluente, ajuste de pH=8,0 com NaOH 1,0 M, 0 mM de CaCl₂ e 0,50 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,00	0,34	3,06	0
60	2,01	2,68	24,00	20,94
120	2,01	2,96	26,51	23,45
180	2,27	4,35	34,49	31,43
240	2,00	3,55	31,95	28,89
300	2,00	3,65	32,85	29,79
360	2,00	3,75	33,75	30,69
480	2,00	3,93	35,37	32,31
720	2,00	4,16	37,44	34,38
900	2,01	4,22	37,79	34,73
1080	2,00	4,34	39,09	36,03
1200	2,02	4,48	40,32	37,26
1440	2,00	4,52	40,28	37,22

Ensaio 6: 100 g de efluente, ajuste de pH=8,0 com NaHCO₃ 1,0 M, 10 mM de CaCl₂ e 0,50 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	1,99	0,42	3,80	0
60	2,00	2,41	21,69	17,89
120	2,00	2,50	22,50	18,7
180	2,00	2,55	22,95	19,15
240	2,00	2,41	21,69	17,89
300	2,02	2,28	20,32	16,52
360	2,02	2,83	25,22	21,42
480	2,00	2,92	26,28	22,48
720	2,00	3,49	31,41	27,61
900	2,01	3,89	34,83	31,03
1080	2,00	3,97	35,73	31,93
1200	2,00	4,11	36,99	33,19
1440	2,02	4,43	39,48	35,68

Ensaio 7: 100 g de efluente, ajuste de pH=8,0 com NaHCO₃ 1,0 M, 10 mM de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	1,99	0,42	3,80	0
60	2,02	2,22	19,78	15,98
120	2,02	2,83	25,22	21,42
180	2,00	3,10	27,90	24,10
240	2,04	2,97	26,51	22,71
300	2,06	2,60	22,72	18,92
360	2,00	2,10	18,90	15,10
480	2,01	1,93	17,28	13,48
720	2,00	2,15	19,35	15,55
900	2,01	2,38	21,31	17,51
1080	2,00	2,61	23,49	19,69
1200	2,00	2,74	24,66	20,86
1440	2,01	3,08	27,58	23,78

Ensaio 8: 100 g de efluente, ajuste de pH=8,0 com NaOH 1,0 M, 10 mM de CaCl₂ e 0,30 g de enzima

Tempo (min)	Massa de emulsão (g)	Volume de KOH (mL)	Ácidos graxos livres (mM)	Ácidos graxos formados (mM)
0	2,05	0,38	3,34	0
60	2,00	2,47	22,23	18,89
120	2,02	3,01	26,81	23,47
180	2,01	3,17	28,39	25,05
240	2,00	3,27	29,43	26,09
300	2,01	3,36	30,09	26,75
360	2,00	3,55	31,95	28,61
480	2,07	3,72	32,35	29,01
720	2,01	4,01	35,91	32,57
900	2,00	4,29	38,61	35,27
1080	2,01	4,58	41,01	37,67
1200	2,00	4,62	41,58	38,24
1440	2,05	4,88	42,85	39,51

Apêndice 8.5. Testes de Atividade metanogênica

A-Atividade metanogênica do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente por um período de 24 h.

Condições experimentais: 300 mL de efluente, 50 mL de lodo anaeróbico, Temperatura 35°C e Agitação mecânica 200 rpm.

Tempo de Biodigestão (dia)	Volume Acumulado de CH ₄ (mL)	
	Efluente Bruto	Efluente Hidrolisado (24 h)
0	0 ± 0	0 ± 0
1	23 ± 11,1	103,8 ± 4,60
2	37,6 ± 11,4	150,6 ± 7,81
3	51,8 ± 13,8	162,4 ± 4,22
4	67,6 ± 16,7	172,8 ± 4,76
5	81,4 ± 20,2	183,4 ± 5,33
6	97,6 ± 24,1	192,0 ± 6,65
7	107,2 ± 26,1	195,6 ± 6,06
8	114,0 ± 27,8	200,0 ± 5,64
9	125,8 ± 31,0	207,8 ± 6,28
10	134,0 ± 32,4	215,2 ± 6,44
11	143,6 ± 34,8	225,8 ± 6,64
12	145,0 ± 34,9	231,8 ± 6,46
13	197,0 ± 0	234,5 ± 19,5
14	199,0 ± 0	239,0 ± 21,0
15	199,0 ± 0	243,0 ± 25,0
16	199,0 ± 0	243,0 ± 25,0
17	199,0 ± 0	243,0 ± 25,0
18	199,0 ± 0	243,0 ± 25,0
19	199,0 ± 0	243,0 ± 25,0
20	203,0 ± 0	245,5 ± 26,5
21	203,0 ± 0	245,5 ± 26,5
22	204,0 ± 0	251,5 ± 30,5
23	217,0 ± 0	263,0 ± 33,0
24	217,0 ± 0	263,0 ± 33,0
25	217,0 ± 0	263,0 ± 33,0
26	218,0 ± 0	268,0 ± 31,0
27	219,0 ± 0	272,0 ± 31,0
28	220,0 ± 0	276,5 ± 28,5

B-Atividade metanogênica do efluente bruto e pré-tratado enzimaticamente por por 4-24 h e o controle suplementado com enzima.

Condições experimentais: 300 mL de efluente, 50 mL de lodo anaeróbico, Temperatura 35°C e Agitação 200 rpm.

Tempo de biodigestão (dia)	Volume Acumulado de CH ₄ formado (mL)					
	C ₁	Tratado enzimaticamente				
		C ₂	4 h	8 h	12 h	24 h
1	108 ± 8	223 ± 38	181 ± 18	157 ± 15	246 ± 21	289 ± 16
2	113 ± 12	300 ± 30	312 ± 4	308 ± 15	360 ± 21	349 ± 43
3	122 ± 21	315 ± 39	331 ± 6	326 ± 16	369 ± 28	359 ± 44
4	137 ± 27	322 ± 39	346 ± 8	340 ± 8	382 ± 19	367 ± 40
5	149 ± 35	327 ± 37	358 ± 6	353 ± 3	401 ± 20	371 ± 39
6	163 ± 43	334 ± 33	367 ± 0	357,5 ± 2	414 ± 23	374 ± 36
7	176 ± 50	337 ± 32	376 ± 2	361 ± 1	425 ± 29	379 ± 34
8	185 ± 51	338 ± 33	383 ± 3	364 ± 1	432 ± 37	389 ± 27
9	193 ± 53	343 ± 31	388 ± 2	370 ± 3	435 ± 36	392 ± 28
10	199 ± 51	348 ± 33	394 ± 4	374 ± 3	437 ± 35	395 ± 29
11	203 ± 50	351 ± 35	397 ± 4	379 ± 1	440 ± 33	399 ± 29
12	205 ± 48	352 ± 35	398 ± 4	381 ± 1	442 ± 32	401 ± 30
13	207 ± 47	352 ± 36	400 ± 4	382 ± 1	443 ± 31	403 ± 30
14	208 ± 47	352 ± 35	401 ± 4	383 ± 0	444 ± 30	435 ± 0
15	209 ± 47	353 ± 34	403 ± 4	383 ± 2	445 ± 29	437 ± 0

C1: Efluente Bruto

C2: Efluente hidrolisado e biodegradado simultaneamente.

Apêndice 8.6. Lista de Divulgação dos Resultados

Este trabalho deu origem a diversas publicações em diferentes meios de divulgação, como a seguir listadas:

CASTRO, Heizir Ferreira de; MENDES, Adriano Aguiar; PEREIRA, Ernandes Benedito; FURIGO JR, Agenor. Biodegradabilidade anaeróbia de águas residuárias de indústrias de produtos avícolas e lácteos previamente tratadas com enzimas hidrolíticas. 2004. Patente: Privilégio e Inovação. PI0402587-3, "Biodegradabilidade anaeróbia de águas". 30 de jan. de 2004 (Depósito).

MENDES, Adriano Aguiar; CASTRO, Heizir Ferreira de. Redução do Teor de Lipídeos Presentes em Efluentes das Indústrias de Produtos Lácteos empregando Lipases Pancreáticas. Revista Saúde e Ambiente, UNIVILLE-Blumenau, v. 5, n. 1, p. 31-39.

MENDES, Adriano Aguiar; CASTRO, Heizir Ferreira de; PEREIRA, Ernandes Benedito; FURIGO JR, Agenor. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevado teor de lipídeos. Química Nova, SBQ- São Paulo (in press).

CASTRO, Heizir Ferreira de; MENDES, Adriano Aguiar; SANTOS, Júlio César dos; AGUIAR, Cláudio Lima de. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Química Nova, SBQ- São Paulo, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

FREITAS, Larissa de; MENDES, Adriano Aguiar; CASTRO, Heizir Ferreira de. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação com lipase imobilizada em resíduo agroindustrial. Anais da Associação Brasileira de Química, São Carlos-SP, v. 52, n. 2, p. 88-92, 2003.

MENDES, Adriano Aguiar; CASTRO, Heizir Ferreira de. Efeito da substituição de emulsificantes não iônicos por cloreto de sódio na hidrólise de lipídeos presentes em efluentes de laticínios empregando lipases pancreáticas comerciais. In: XV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2004, Curitiba/PR. Programa /Trabalhos completos. Curitiba-PR: UFPR, 2004. v. 1, p. 1-8. (CD-ROM).

MENDES, Adriano Aguiar; FREITAS, Larissa de; CASTRO, Heizir Ferreira de. Biodegradabilidade anaeróbia de lipídeos e proteínas presentes em efluentes das industriais de laticínios empregando enzimas hidrolíticas. In: ENZITEC 2004, 2004, Rio de Janeiro. Resumo e programação do ENZITEC. Rio de Janeiro: UFRJ-INT, 2004. v. 1, p. 229-229.

MENDES, Adriano Aguiar; CASTRO, Heizir Ferreira de. Biotratamento para redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis-SC. Programa /Trabalhos completos. Florianópolis-SC: UFSC, 2003. v. 1, p. 1-6.

MENDES, Adriano Aguiar; FREITAS, Larissa de; CASTRO, Heizir Ferreira de. Hidrólise enzimática de óleos vegetais por lipase livre e imobilizada em palha de arroz. In: VII SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 2002, Maringá-PR. SHEB 2002. Maringá-PR: UEM/DEQ, 2002. v. 1, p.118-118.

GOMES, Fabrício Maciel; MENDES, Adriano Aguiar; URIOSTE, Daniele; CASTRO, Heizir Ferreira de. Propriedades cinéticas de preparações comerciais de lipases oriundas de fontes animal e microbiana. In: VI INIC-ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/II EPG-ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO LATINO AMERICANO, 2002, São José dos Campos. Anais de Resumos- VI INIC - ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ II EPG-ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO LATINO AMERICANO.