

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG
CAMPUS AVANÇADO DE POÇOS DE CALDAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA - PPGEQ

ALEX MARQUITI ALVES

**PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE EFLUENTES COM ELEVADO TEOR DE
GORDURA EMPREGANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS LIPOLÍTICAS**

POÇOS DE CALDAS/MG

2018

ALEX MARQUITI ALVES

**PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE EFLUENTES COM ELEVADO TEOR DE
GORDURA EMPREGANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS LIPOLÍTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Grazielle Santos Silva Andrade.

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Brito de Moura.

POÇOS DE CALDAS/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

A474p Alves, Alex Marquiti.

Pré-tratamento enzimático de efluentes com elevado teor de
gordura empregando células íntegras lipolíticas / Alex Marquiti Alves.
– Poços de Caldas/MG, 2018.
82 f. –

Orientador(a): Grazielle Santos Silva Andrade.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade
Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2018.
Bibliografia.

1. Células íntegras. 2. Hidrólise. 3. Tratamento de efluente. 4.
Lipídios. 5. Biodigestão anaeróbica. I. Andrade, Grazielle Santos
Silva. II. Título.

CDD – 660

ALEX MARQUITI ALVES

**PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE EFLUENTES COM ELEVADO TEOR DE
GORDURA EMPREGANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS LIPOLÍTICAS**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química pela Universidade Federal de
Alfenas, *campus* Poços de Caldas/MG.

Aprovado em: 23/02/18

Professor: Dr^a. Grazielle Santos Silva Andrade

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Assinatura: Grazielle S.S. Andrade

Professor: Dr^a. Giselle Patrícia Sancinetti

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Assinatura: Giselle P. Sancinetti

Professor: Dr. Dagoberto Yukio Okada

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Assinatura: DY Okada

Confie em Deus, acredite nos seus sonhos, crie expectativas positivas sobre eles, obstáculos aparecem para nos lembrar que a vitória fará jus às barreiras superadas.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por estarem sempre comigo, me protegendo, abençoando, guiando os meus caminhos e principalmente por renovar as minhas forças, fornecendo discernimento e sabedoria em momentos difíceis.

Aos meus pais, Elidiane Silvia Marquiti Junqueira e Robinson Alves, pelo apoio e amizade, por acreditar em mim sempre e não medirem esforços para a realização dos meus sonhos sob quaisquer circunstâncias, vocês são e sempre serão a base de tudo.

A minha avó materna Arminda Martimbianco Marquiti (*in memoriam*), por todos os lindos momentos que passamos juntos enquanto estava presente entre nós, que você continue cuidando de mim assim como fazia anteriormente. Saiba que sempre me lembrarei de você, nesta e em todas as outras conquistas que virão.

Aos meus irmãos, irmãs e demais familiares, por todo o companheirismo, apoio e incentivo.

A minha namorada por todo carinho e por estar sempre ao meu lado me ouvindo, me incentivando e me aconselhando.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Grazielle Santos Silva Andrade e ao meu co-orientador Prof. Dr. Rafael Brito de Moura, pela dedicação, compreensão, aprendizagem, apoio e amizade ao decorrer do desenvolvimento deste projeto, todo o conhecimento compartilhado foi de extrema importância.

As amigas que construí ao longo da minha vida acadêmica, muito obrigado por todo conselho, ajuda e convivência, levarei vocês em meu coração.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Aos professores que compõem a banca examinadora pela disposição e atenção.

A todos os professores, funcionários e técnicos da Universidade Federal de Alfenas, *campus* Poços de Caldas/MG, que contribuíram de forma direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos órgãos financiadores do projeto, FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

RESUMO

Efluentes da indústria de laticínios apresentam elevados teores de lipídeos, sendo muitas vezes lançados em cursos d'água sem tratamento prévio. Devido à baixa solubilidade em água e solidificação em temperatura ambiente, os lipídeos podem causar muitos problemas a biodigestão anaeróbia, reduzindo o potencial de biodegradabilidade do efluente. Como alternativa, a tecnologia enzimática tem sido utilizada para o desenvolvimento de produtos e processos menos agressivos ambientalmente. Porém, fatores associados ao alto custo de obtenção das enzimas, relacionados as onerosas etapas de extração e purificação, inviabilizam a sua aplicação em escala industrial. Neste contexto, células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* URM 4216 foram produzidas e utilizadas na hidrólise enzimática de efluente contendo elevadas concentrações de lipídeos, facilitando a posterior aplicação do tratamento anaeróbio do efluente. As células íntegras foram cultivadas em meio de cultura contendo por litro: fonte de carbono (30 g), fonte de nitrogênio (70 g), NaNO₃ (1 g), KH₂PO₄ (1 g) e MgSO₄.7H₂O (0,5 g) em erlenmeyers sob agitação orbital, por um período de incubação de 96h. A atividade da lipase foi medida tanto na biomassa seca (lipase ligada ao micélio) como no filtrado (lipase extracelular). A produção de lipase ligada ao micélio foi maximizada quanto aos parâmetros físico-químicos, óleos de carbono (azeite, soja, canola e girassol) e nitrogênio (peptona de soja, peptona bacteriológica e extrato de levedura), pH inicial do meio (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), temperatura de fermentação (30 e 40 ° C) e quantidade de inóculo (10⁵; 10⁶; 10⁷; 10⁸ esporos), a fim de determinar as melhores condições do cultivo celular. O óleo de oliva e a peptona de soja foram as melhores fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, e o ajuste do meio de cultura a pH 7,0 e 30 ° C de temperatura de incubação com quantidade de inóculo de 10⁷ esporos melhoraram a atividade da lipase ligada ao micélio. Sob as condições otimizadas, as células íntegras foram preparadas e apresentaram uma atividade lipolítica de 240 ± 18 U/g contra apenas 15,2 ± 1,4 U/g do filtrado, indicando a retenção de lipase no micélio. O desempenho de células íntegras foi avaliado em hidrólise de águas residuais, apresentando resultados promissores. A taxa de produção de ácidos graxos apresentou um incremento de 12 vezes aos valores obtidos para o mesmo efluente sem tratamento enzimático, em 6h de reação. Também foram realizados testes de hidrólise enzimática dos despejos industriais, utilizando enzimas livres e imobilizadas, os quais o emprego de células livres em meio reacional pH 8,0 se sobressaíram frente as demais condições, apresentando um percentual de hidrólise enzimática em torno de 92,5±0,4 %, para um tempo máximo de 48h de reação. Para a realização do teste de atividade metanogênica específica, foi verificado o emprego simultâneo de células íntegras lipolíticas, inóculo e efluente (condição 1), efluente pré-hidrolisado e inóculo (condição 2), e a biodigestão anaeróbia do efluente industrial e inóculo (condição 3/control), por um período máximo de 72h. Os ensaios foram avaliados pelo modelo de Gompertz modificado, indicando um menor tempo de fase lag mediante o emprego de células íntegras lipolíticas (condição 2). Não foram alcançadas remoções significativas de DQO do efluente quando comparadas aos resultados obtidos para o processo de biodigestão anaeróbia do efluente bruto mais inóculo. A taxa máxima de produção de metano foi alcançada em menor tempo para os ensaios que envolvem o tratamento híbrido de efluentes com alto teor de gorduras. Os resultados demonstraram o potencial de aplicação, ainda pouco explorado, do pré-tratamento enzimático como parte integrante do tratamento biológico de efluentes que contem elevados teores de lipídeos.

Palavras-chave: Células Íntegras. Hidrólise. Tratamento. Lipídeos. Biodigestão anaeróbia.

ABSTRACT

Dairy industry wastewater contain high levels of lipids, being often dumped into watercourses without previous treatment. Due to the low solubility in water and solidification at room temperature, the lipids cause many problems to the anaerobic digestion, reducing the effluent biodegradability. As an alternative the enzymatic technology has been used to the development of products and processes less aggressive in environmental terms. However, factors associated with the high cost of obtaining the enzymes, related to the extraction and purification steps, make it impossible to apply them on an industrial scale. In this context, whole cells from the filamentous fungus *Penicillium citrinum* URM 4216 was prepared and used to perform the enzymatic hydrolysis of lipid-rich wastewater, facilitating the subsequent application of the anaerobic effluent treatment. The whole cells were cultivated in a basal medium containing per litre: carbon source (30 g), nitrogen source (70 g), NaNO₃ (1 g), KH₂PO₄ (1 g) and MgSO₄·7H₂O (0.5 g) in flasks under orbital agitation for 96 h. Lipase activity was measured both dry biomass (mycelium-bound lipase) and filtrate (extracellular lipase). The mycelium-bound lipase production was maximized and physicochemical parameters, such as carbon (olive, soybean, colza and sunflower oils) and nitrogen (soy peptone, bacterial peptone and yeast extract) sources, initial pH of the medium (5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 and 8.0), temperature of fermentation (30 and 40°C) and inoculum size (10⁵; 10⁶; 10⁷; 10⁸ spores) were studied to determine the best conditions for mycelium-bound lipase production. Olive oil and soy peptone were found to be the best carbon and nitrogen sources, respectively, and the adjustment of the culture broth to pH 7.0 and 30°C of incubation temperature with inoculum size of 10⁷ spores improved the mycelium-bound lipase activity. Under the optimized conditions, the whole cells were prepared and showed the lipase activity of 240 ± 18 U g⁻¹ against only 15.2 ± 1.4 U g⁻¹ to the filtrated, indicating the retention of lipase into the mycelium. The performance of whole cells was evaluated in the hydrolysis of crude milk wastewater, showing promising results. The rate of fatty acid production increased by 12 times the values presented for the same type of effluent without enzymatic treatment, to 6 hours of reaction. Tests were also carried out on the enzymatic hydrolysis of industrial wastewater, using free and immobilized enzymes. The use of free cells in reactive medium pH 8.0 showed a high percentage of enzymatic hydrolysis around 92.5 ± 0.4 % to 48 hours of reaction. In order to perform the specific methanogenic activity test (SMA), was checked the simultaneous use of lipolytic whole cells, inoculum and crude wastewater (condition 1), prehydrolysed wastewater and inoculum (condition 2), and anaerobic biodigestion of the crude wastewater and inoculum (condition 3 / control), for a maximum period of 72h. The assays were evaluated by the Gompertz model, indicating a lower lag phase for the process involving the enzymatic treatment (condition 2). No significant COD removals were obtained from the industrial wastewater when compared to the results obtained for the anaerobic biodigestion process of crude wastewater plus the inoculum. The maximum rate of methane production was achieved in less time for trials involving the hybrid treatment of lipid-rich wastewater. The results demonstrated the potential for the application of enzymatic pretreatment as an integral part of the biological treatment of lipid-rich wastewater.

Keywords: Whole cells. Hydrolysis. Wastewater treatment. Lipids. Anaerobic Digestion.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	15
3.1.1	<i>Processos biológicos e a biodigestão anaeróbia</i>	16
3.1.1.1	<i>Atividade metanogênica específica (AME)</i>	19
3.2	EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS.....	20
3.3	PROBLEMAS RELACIONADOS AO TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTES COM ALTO TEOR DE LIPÍDEOS.....	23
3.4	PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE EFLUENTES COM ELEVADO TEOR DE LIPÍDEOS	25
3.5	LIPASES	26
3.5.1	<i>Hidrólise enzimática de lipídeos</i>	27
3.5.2	<i>Fatores que influenciam a hidrólise enzimática de lipídeos</i>	29
3.6	PRODUÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS NA HIDRÓLISE DE EFLUENTES COM ELEVADO TEOR DE LIPÍDEOS.....	31
3.7	IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS	32
4	METODOLOGIA	34
4.1	MATERIAIS.....	34
4.1.1	<i>Micro-organismo</i>	34
4.1.2	<i>Suporte de imobilização</i>	34
4.1.3	<i>Meio de cultura</i>	34
4.1.4	<i>Efluentes</i>	34
4.1.5	<i>Lodo Anaeróbio</i>	35
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
4.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	35
4.3.1	<i>Preparação e imobilização das células íntegras</i>	35
4.3.2	<i>Influência de parâmetros nutricionais e físico-químicos na produção de lipase ligada ao micélio das células íntegras livres</i>	37
4.3.3	<i>Reações de hidrólise enzimática sob agitação em Shaker</i>	37
4.3.4	<i>Determinação do potencial de biodegradabilidade anaeróbia e produção de gás metano do efluente industrial</i>	39
4.4	METODOLOGIA ANALÍTICA	41
4.4.1	<i>Determinação do teor de umidade das células íntegras</i>	41
4.4.2	<i>Determinação da atividade hidrolítica das células íntegras</i>	41
4.4.3	<i>Determinação da concentração de ácidos graxos livres</i>	42
4.4.4	<i>Determinação da concentração de lipídeos</i>	42
4.4.5	<i>Teor de sólidos e demanda química e oxigênio</i>	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PREPARO DAS CÉLULAS ÍNTEGRAS LIVRES	44

5.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES	52
5.3	PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO SORO DE LEITE E EFLUENTE INDUSTRIAL EMPREGANDO CÉLULAS LIVRES	53
5.3.1	<i>Avaliação da influência de DQO na hidrólise enzimática do soro de leite sintético</i>	53
5.3.2	<i>Influência do carregamento de atividade fornecida pelas células íntegras livres na hidrólise enzimática do soro de leite sintético e do efluente.....</i>	57
5.3.3	<i>Influência do pH do substrato na hidrólise enzimática do efluente.....</i>	60
5.4	PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO SORO DE LEITE E EFLUENTE EMPREGANDO CÉLULAS ÍNTEGRAS IMOBILIZADAS.....	61
5.4.1	<i>Influência da atividade fornecida na hidrólise enzimática do soro de leite sintético</i>	63
5.4.2	<i>Influência do pH do substrato na hidrólise enzimática do efluente.....</i>	66
5.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA E PRODUÇÃO DE GÁS METANO.....	67
6	CONCLUSÕES	73
7	SUGESTÕES FUTURAS	75
	REFERÊNCIAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sequenciamento das etapas envolvidas na biodigestão anaeróbia.....	19
Figura 2	Reações catalisadas pelas lipases.....	28
Figura 3	Representação da hidrólise de triglicerídeos.....	29
Figura 4	Fluxograma de blocos referente ao procedimento de execução do projeto de pesquisa.	36
Figura 5	Esquematização do sistema de coleta e quantificação de gás metano no ensaio de atividade metanogênica específica (AME).....	40
Figura 6	Perfil de crescimento celular (■), atividade lipolítica do filtrado (■) e da biomassa (■) empregando diferentes fontes de carbono a 30 g/L no cultivo das células íntegras do fungo filamentosso <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: FN peptona de soja 70g/L, pH 7,0, 30°C e 1x10 ⁶ esporos.....	45
Figura 7	Perfil de crescimento celular (■), atividade lipolítica do filtrado (■) e da biomassa (■) empregando diferentes fontes de nitrogênio no cultivo das células íntegras do fungo filamentosso <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: FC óleo de oliva 30g/L, pH 7,0, 30°C, 1x10 ⁶ esporos (*35 g/L, **50 g/L e ***70 g/L).	47
Figura 8	Perfil de crescimento celular (■), atividade lipolítica do filtrado (■) e da biomassa (■) empregando diferentes pHs no cultivo das células íntegras do fungo filamentosso <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: FC óleo de oliva 30g/L, FN peptona de soja 70g/L, 30°C e 1x10 ⁶ esporos.....	48
Figura 9	Perfil de crescimento celular (■), atividade lipolítica do filtrado (■) e da biomassa (■) empregando diferentes quantidades de inóculo no cultivo das células íntegras do fungo filamentosso <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: FC óleo de oliva 30g/L, FN peptona de soja 70g/L, 30°C e pH 7,0.	50
Figura 10	Influência da concentração de DQO (mg/L) na hidrólise do soro de leite sintético empregando células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: pH inicial 8, 37°C, 8.300 U, 6 h. Erro analítico: 3%.....	54
Figura 11	Perfil do pH obtido ao final da hidrólise do soro de leite sintético (■) sem pré-tratamento (controle) e (□) com pré-tratamento empregando células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: pH inicial 8, 37°C, 8.300 U, 6 h. Erro analítico: 1%.....	55
Figura 12	Perfil da formação de ácidos graxos livres, em mmol/L, ao final da hidrólise do soro de leite sintético (■ sem pré-tratamento/controle; ■ com pré-tratamento) empregando células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: pH inicial 8, 37°C, 8.300 U, 6 h. Erro analítico: 3%.....	56
Figura 13	Perfil cinético da hidrólise do soro de leite sintético empregando diferentes carregamentos enzimáticos (Δ 1.300 U; ■ 2.300 U e □ 4.500 U) das células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: pH 8, 37°C, DQO 50.000 mg/L, 24 h.	58
Figura 14	Perfil cinético da hidrólise do efluente bruto industrial (□) e do soro de leite sintético (■), DQO 50.000 mg/L, empregando células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: pH 8, 37°C, 1.300 U, 48 h.....	59
Figura 15	Perfil cinético da hidrólise do efluente bruto industrial, DQO 50.000 mg/L, sob diferentes pHs (Δ 4,0 <i>in natura</i> ; ■ 7,0 e □ 8,0) empregando células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: 37°C, 1.300 U, 48 h.	61
Figura 16	Morfologia das células íntegras livres (a) e das células íntegras imobilizadas em espumas cúbicas de poliuretano (b). Condições de cultivo: pH 8, 30°C, 96h.	

	62
Figura 17	Perfil cinético da hidrólise do soro de leite sintético empregando diferentes carregamentos enzimáticos (■ 700 U e □ 1.300 U) das células íntegras imobilizadas de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: pH 8, 37°C, DQO 50.000 mg/L, 24 h.	63
Figura 18	Perfil cinético da hidrólise do efluente bruto industrial (□) e do soro de leite sintético (■), DQO 50.000 mg/L, empregando células íntegras imobilizadas de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: pH 8, 37°C, 1.300 U, 48 h.....	65
Figura 19	Perfil cinético da hidrólise do efluente bruto, DQO 50.000 mg/L, sob diferentes pHs (Δ 4,0 <i>in natura</i> ; ■ 7,0 e □ 8,0) empregando células íntegras imobilizadas de <i>P. citrinum</i> . Condições de cultivo: 37°C, 1.300 U, 48 h.....	66
Figura 20	Perfil experimental e ajuste ao modelo de Gompertz modificado para as três condições verificadas no teste de atividade metanogênica específica (AME). Condições de ensaio: 350 mL de efluente em pH 7, 106 mL de inóculo granular da Avícola Dacar® e 1.300 U presentes nos ensaios que requerem a utilização de enzimas lipolíticas livres.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Níveis de tratamento de águas residuárias e suas aplicações.	16
Tabela 2	Caracterização do efluente de uma indústria de produtos lácteos.	22
Tabela 3	Concentração de lipídeos em águas residuárias e suas principais fontes de geração.	23
Tabela 4	Influência da concentração de lipídeos na biodigestão anaeróbia.	25
Tabela 5	Composição média de ácidos graxos presentes no soro de leite sintético laticínios Porto Alegre [®] e no efluente da indústria de produtos lácteos Bandeira [®]	38
Tabela 6	Constituição do meio reacional para realização do teste de atividade metanogênica específica (AME).	39
Tabela 7	Determinação das melhores condições de cultivo de células integras do fungo filamentosso <i>Penicillium citrinum</i>	51
Tabela 8	Caracterização do efluente da indústria de produtos lácteos Bandeira [®] e de uma solução contendo soro de leite sintético em uma concentração de DQO 50.000 mg/L.	52
Tabela 9	Concentração de lipídeos para diferentes concentrações de DQO (mg/L) do soro de leite sintético.	54
Tabela 10	Parâmetros da fase lag, taxa máxima de produção de metano e produção máxima de metano, obtidos do ajuste ao modelo matemático de Gompertz modificado para cada condição analisada.	68
Tabela 11	Caracterização do efluente industrial Bandeira [®] anterior e posterior teste de atividade metanogênica específica (AME) para cada condição analisada.	70

1 INTRODUÇÃO

Devido ao crescimento populacional, impulsionado pela crescente taxa de urbanização e aumento da economia, a demanda mundial por produtos alimentícios está continuamente crescendo, aumentando de forma indireta os impactos ambientais associados a geração de seus efluentes (NOTARNICOLA et al., 2012). As indústrias de produtos lácteos apresentam de forma significativa um importante setor alimentício, tanto do ponto de vista econômico quanto social (EMBRAPA, 2015).

Em estudo realizado no ano de 2008, 81,7% dos laticínios em atividade no Brasil eram considerados microempresas, as micro e pequenas empresas do setor alimentício, juntas, correspondiam a 94,7% do total de indústrias no País (CARVALHO, 2010). Considerando as políticas de controle ambiental vigentes, associadas as restrições financeiras muitas vezes apresentadas por estas empresas, o problema se agrava, assumindo que muitas destas indústrias lançam seus efluentes em cursos d'água sem nenhum tipo de tratamento, apresentando uma representativa contribuição frente a poluição hídrica, principalmente no que diz respeito a carga orgânica associada a este tipo de efluente (SARAIVA; PEREIRA, 2009).

Os efluentes gerados pelas indústrias de laticínios, no beneficiamento do leite, apresentam em média uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) em torno de 3.000 mg/L, tendo seu valor elevado a aproximadamente 50.000 mg/L quando relacionado a produção de queijo e derivados, apresentando, deste montante, um teor de lipídeos superior a 800 mg/L (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; LEAL et al., 2006).

Efluentes contendo elevadas concentrações de lipídeos (óleos e gorduras), apresentam, além dos impactos ambientais supracitados, um obstáculo diante à aplicação de sistemas de tratamento convencionais, tendo como etapa limitante a liberação lenta de ácidos graxos pelos micro-organismos específicos com atividade lipolítica durante o processo de biodigestão anaeróbia. Em virtude da baixa solubilidade em água e solidificação em temperatura ambiente, os lipídeos reduzem a biodegradabilidade nos efluentes, causam flotação da biomassa, má formação de grânulos de lodo em reatores anaeróbios do tipo UASB, formação de espumas associada ao acúmulo de ácidos graxos não biodegradados, toxicidade aos micro-organismos acetogênicos e metanogênicos, além do decréscimo da concentração de trifosfato de adenosina (ATP), utilizada como fonte de energia pelos micro-organismos responsáveis pela biodegradação, reduzindo a eficiência dos processos biológicos convencionais de tratamento

de águas residuárias (MENDES, 2004).

Visando reduzir o teor de lipídeos presentes nos efluentes com elevada carga lipídica, muitas indústrias alimentícias empregam processos físico-químicos em seus sistemas de tratamento, a fim de separar tais lipídeos, destacando-se a flotação, a coagulação e a floculação (KARADAG et al., 2015). Entretanto, além de aumentarem os custos associados ao tratamento, o qual geralmente não apresentam um resultado satisfatório no que diz respeito à remoção da matéria orgânica, estes processos apenas dividem o efluente inicial a ser tratado em dois, um com baixo teor de lipídeos e outro com alto teor de lipídeos (METCALF; EDDY, 2016).

Como alternativa aos processos de tratamento de águas residuárias convencionais, o uso da tecnologia enzimática atuando na biodegradação de lipídeos, por meio da utilização de lipases para promoção da reação de hidrólise via sequencial dos grupos acila no glicerídeo, vem mostrando-se cada vez mais promissora no tratamento de efluentes com elevado teor de lipídeos, uma vez que, utilizando-se de enzimas comerciais ou preparados enzimáticos, estes removem de forma específica a matéria orgânica com elevado teor lipídico (JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI; DEBOWSKI, 2008).

Lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C.3.1.1.3) são definidas como um conjunto de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis (ARAÚJO et al., 2016; CASTRO et al., 2004). As vantagens associadas a esse tipo de tratamento compreendem o controle de produtos, permitindo o aumento dos rendimentos pela não geração de subprodutos tóxicos, condições amenas de operação e a redução de custos em termos de energia e de equipamentos, sendo um processo muito atrativo do ponto de vista ambiental (MASSE; KENNED; CHOU, 2001).

Devido ao alto custo de produção e a baixa produtividade relacionada, para que o processo se torne viável, faz-se necessária a busca por alternativas de produção via processos de baixo custo, dispensando etapas onerosas de separação e purificação de enzimas. Neste contexto, o presente trabalho visa produzir células íntegras com elevada atividade lipolítica, dispensando as etapas de extração e purificação das enzimas requeridas em um processo de biocatálise convencional, viabilizando-se assim a sua utilização no pré-tratamento de efluentes com elevado teor lipídico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo realizar a hidrólise enzimática como pré-tratamento de efluentes com alto teor de lipídeos utilizando células íntegras de fungos filamentosos com elevada atividade lipolítica como biocatalisador, a fim de avaliar o efeito no potencial de biodegradabilidade e na atividade metanogênica do efluente.

2.2 Objetivos específicos

Para alcançar esse propósito, as seguintes etapas foram executadas:

- a. Produção de um biocatalisador ativo e estável a partir de células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* nas formas livre e imobilizada em espumas cúbicas de poliuretano;
- b. Determinação das melhores condições de produção de lipase ligada ao micélio a partir da variação dos parâmetros nutricionais e físico-químicos, quanto a fonte de carbono, nitrogênio, pH, temperatura e quantidade de inóculo;
- c. Emprego das células íntegras lipolíticas nas formas livre e imobilizada em reações de hidrólise do soro de leite sintético e efluente bruto proveniente de indústria láctea;
- d. Determinação das condições ótimas de atuação das células íntegras nas reações de hidrólise do soro de leite sintético e efluente bruto por meio da variação da concentração de DQO, razão m/v (massa/volume) de biocatalisador e meio reacional e quantidade de atividade enzimática fornecida do biocatalisador;
- e. Avaliação do potencial de biodegradabilidade anaeróbia e produção de gás metano, em reator batelada, do efluente bruto e pós tratamento enzimático com células íntegras livres de *P. citrinum*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico foram abordados os principais temas relacionados a produção e utilização de enzimas lipolíticas presentes em células íntegras, livres ou imobilizadas, para a realização da hidrólise enzimática de efluentes com elevados teores de gorduras, auxiliando no posterior processo de biodigestão anaeróbia como parte integrante do tratamento de águas residuárias.

3.1 Tratamento de águas residuárias

O desenvolvimento de um sistema de tratamento de águas residuárias é específico para cada tipo de efluente. O projeto adequado de um sistema de tratamento varia em função do volume, da concentração dos despejos e de sua caracterização. Nesta etapa, são obtidas informações a respeito da composição do efluente, de sua vazão e se há variações em função do tempo ao longo das atividades que o geram.

Com base nestas informações, são realizadas as melhores escolhas dentre os métodos físico-químicos, classificados em nível preliminar e primário de tratamento, e/ou biológicos, nível secundário, visando o desenvolvimento e equacionamento do sistema de tratamento que apresenta maior eficácia para determinado tipo de efluente (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 2005).

O nível de tratamento terciário emprega processos que objetivam a remoção de poluentes específicos ou atuam na remoção de poluentes de forma complementar ao tratamento secundário, removendo os poluentes que não foram suficientemente removidos ao longo do tratamento secundário. Já os processos de remoção de nutrientes, bem como de organismos patogênicos, podem ser classificados como parte integrante dos níveis de tratamento secundário ou terciário, tendo como critério de classificação o tipo de processo de tratamento adotado (MENDES, 2004; VON SPERLING, 2005).

A Tabela 1 apresenta os níveis de tratamento de águas residuárias e suas descrições.

Tabela 1 - Níveis de tratamento de águas residuárias e suas aplicações.

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

Fonte: Adaptado de VON SPERLING, 2005.

O emprego de métodos físicos de tratamento compreende a remoção de sólidos em suspensão de dimensões relativamente grandes, areias e lipídeos. Neste contexto, são utilizadas grades, peneiras simples ou rotativas, caixas de areia, tanques para a remoção de óleos e graxas, decantadores e filtros de areia. Para a remoção de lipídeos em estado livre (óleos e gorduras), é bastante comum o emprego de tanques de gordura, permitindo a sua separação, de forma manual ou por meio da utilização de raspadores de superfície, do meio contendo o efluente (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 2005).

Os métodos químicos são responsáveis pela remoção de cor, turbidez, odor, material coloidal, ácidos, álcalis e metais pesados. Processos físico-químicos permitem a remoção parcial de sólidos totais, sendo geralmente utilizados agentes químicos como os compostos de sulfato de alumínio, sulfito ferroso e cloreto férrico. Porém, além do alto custo associado a aquisição destes agentes, a remoção de sólidos dissolvidos não é alcançada, ou é realizada de forma reduzida, sendo necessário o emprego de processos biológicos (VIDAL et al., 2000).

3.1.1 Processos biológicos e a biodigestão anaeróbia

Os processos biológicos podem ser classificados em anaeróbios, quanto realizados na ausência de oxigênio molecular, ou em aeróbios, realizados na presença de oxigênio molecular. Ambos os processos apresentam aspectos importantes como a remoção da matéria orgânica,

reduzindo de forma significativa a DQO presente nas águas residuárias, atuando na degradação de compostos químicos orgânicos de difícil degradação, também conhecidos como recalcitrantes, fornecendo um efluente em condições que não afete o equilíbrio do sistema receptor final. O sucesso da aplicação de cada tipo de tratamento está diretamente relacionado ao conhecimento prévio do efluente a ser tratado e da correta operação dos reatores na manutenção da atividade microbiana e das reações de mineralização desejadas (METCALF; EDDY, 2016).

Os processos biológicos aeróbios são realizados por micro-organismos facultativos e aeróbios, enquanto que os processos anaeróbios são realizados por micro-organismos facultativos e anaeróbios, com destaque para as bactérias e as arqueas metanogênicas. O potencial de decomposição apresentado por uma bactéria anaeróbia é específico e depende diretamente das enzimas que as possui, apresentando elevado grau de especificidade (VON SPERLING, 2005).

Lagoa de estabilização aeróbia, lodos ativados e filtros biológicos são os principais tipos de reatores aeróbios. Já no que diz respeito ao principal tipo de reator anaeróbio, o reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB - Upflow Anaerobic Sludge Blanket) se destaca, apresentando a vantagem de reter alta concentração de biomassa com alta produção de biogás (METCALF; EDDY, 2016).

O processo de biodigestão anaeróbia é uma alternativa frente ao tratamento de efluentes, bem como uma fonte para produção de energia, seja em forma de calor ou de eletricidade (TCHOBANOLOUS; BURTON; STENSEL, 2006). A degradação anaeróbia trata-se de um processo catabólico que ocorre na ausência de oxigênio molecular, em que micro-organismos atuam na transformação da matéria orgânica, transformando moléculas mais complexas em moléculas com estruturas mais simples. Como resultado, têm-se a produção de biogás e um efluente mais estabilizado química e micro biologicamente (CHERNICHARO, 2007; DUARTE NETO et al., 2010).

O biogás gerado pela atividade anaeróbia é caracterizado por ser um gás combustível e ter como composição o gás metano, gás carbônico, gás hidrogênio, gás sulfídrico e outros gases inflamáveis (SAGULA, 2012). Essa composição varia de acordo com o material utilizado na decomposição (efluente) e a eficiência do biodigestor (CHERNICHARO, 2007; PORTES, 2005). O gás metano e dióxido de carbono são os principais gases presentes no biogás, representando uma composição no volume do compartimento para biogás entre 40% a 80% e 20% a 60%, respectivamente. Dentre os demais gases existentes no biogás, o teor de nitrogênio

varia de 0,5% a 3%, enquanto o do hidrogênio é de 1% a 10% e o do monóxido de carbono de apenas 0,1% do volume do compartimento destinado a formação de biogás. O biogás também possui traços de gás sulfídrico e oxigênio, porém esta porcentagem não representa nem 1% do volume do reator (CHERNICHARO, 2007).

O processo da biodigestão anaeróbia é sensível e pode ser caracterizado em quatro fases, hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. A primeira fase consiste na hidrólise de substratos complexos insolúveis (lipídios, proteínas e carboidratos) em moléculas menores (ácidos graxos, aminoácidos e açúcares) e solúveis ao meio devido a liberação de enzimas extracelulares das bactérias. Após a etapa da hidrólise, procede-se a fermentação ácida ou acidogênese, que consiste na reação mais rápida da conversão anaeróbia das moléculas complexas. Posteriormente, há a etapa de acetogênese, que consiste na oxidação por meio das bactérias acidogênicas dos ácidos orgânicos obtidos na acidogênese em substratos para as arqueas metanogênicas, como o ácido acético, gás carbônico (CO_2) e hidrogênio (H_2). Finalmente, procede-se a fase de metanogênese, em que as arqueas metanogênicas realizam a fermentação anaeróbia e convertem tais substratos em metano (CH_4) e em dióxido de carbono (CO_2), principais componentes do biogás (CHERNICHARO, 2007; GERARDI, 2003).

De forma a melhor compreender o processo de biodigestão anaeróbia, a Figura 1 representa o sequenciamento de todas as etapas envolvidas durante o processo de biodigestão anaeróbia.

A eficiência global de conversão da matéria orgânica, no processo de biodigestão anaeróbia, depende de cada reação que a constitui, além do equilíbrio apresentado entre as espécies e os grupos de bactérias presentes no sistema anaeróbio (VON SPERLING, 2005).

Fatores como a temperatura do meio, umidade, pH, relação carbono/nitrogênio e inóculo/fonte de carbono, podem favorecer ou não o processo de biodigestão anaeróbia, fazendo-se necessária a realização de análises físico-químicas para melhor caracterização do meio reacional a fim de maximizar o processo de estabilização da matéria orgânica e produção de biogás, minimizando os impactos na degradação dos substratos e dos micro-organismos responsáveis pela biodigestão anaeróbia (SAGULA, 2012).

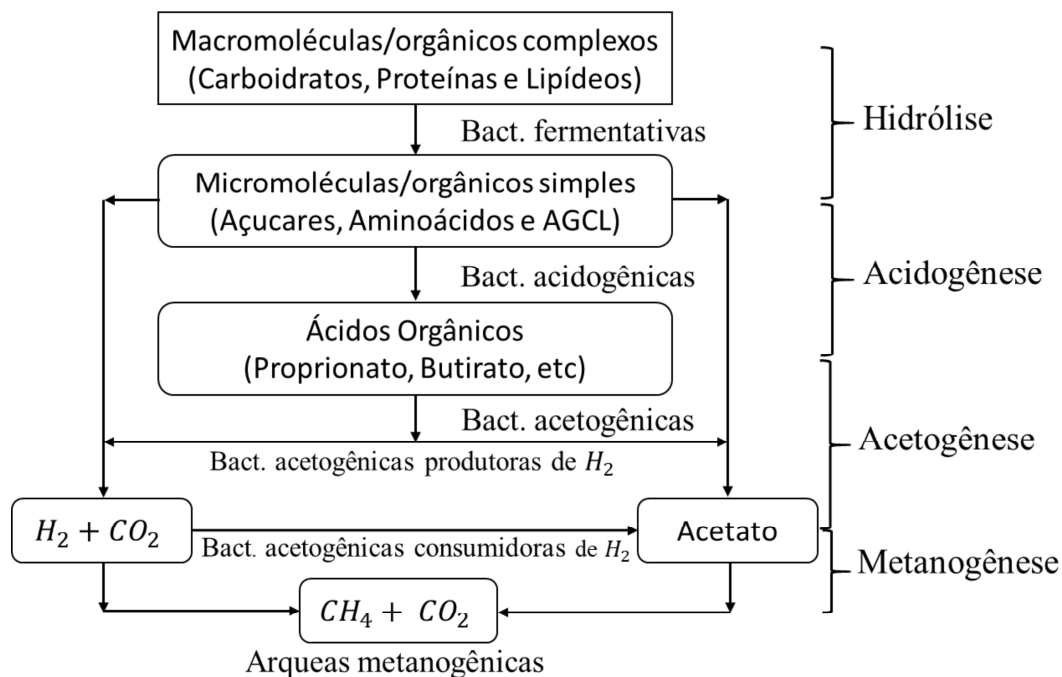


Figura 1 - Sequenciamento das etapas envolvidas na biodigestão anaeróbia.

Fonte: Adaptado de CHERNICHARO, 2007.

3.1.1.1 Atividade metanogênica específica (AME)

A biodigestão anaeróbia é um processo complexo e influenciado por vários fatores tais como a composição do efluente, a configuração do reator e condições de reação. O monitoramento e a preservação da biomassa durante o processo anaeróbio estão diretamente associados ao sucesso desse processo (FLORENTINO et al., 2010; WANG; WAN, 2009).

A fim de que a biomassa seja preservada e monitorada, técnicas de avaliação da atividade microbiana foram desenvolvidas, sendo o teste de Atividade Metanogênica Específica (AME) o mais comumente utilizado. O teste de AME apresenta como principal objetivo, por meio de um ensaio de laboratório, a avaliação da capacidade das bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas na conversão do substrato orgânico em biogás, constituído, na maior parte, de metano e gás carbônico (FLORENTINO et al., 2010). Devido à complexidade das relações entre os diversos grupos de micro-organismos responsáveis pela biodigestão anaeróbia, a busca por avaliações mais profundas deste processo se faz importante para um bom desempenho (AQUINO et al., 2007; BERTOLINO et al., 2008).

Informações acerca da biodigestão anaeróbia, a avaliação de inóculo para a partida de

reatores, obtenção de informações a respeito de diferentes grupos fisiológicos presentes nos lodos, a avaliação de toxicidade por produtos químicos no processo de biodigestão anaeróbia e a investigação da distribuição da atividade bacteriológica em reatores anaeróbios são outras informações que podem ser fornecidas pelo teste da AME (SCHNEIDERS et al., 2013).

Há diversos modelos cinéticos presentes na literatura, tais como o ajuste matemático da equação de Gompertz modificada, Morgan-Mercer-Flodin (MMF), Logística modificado, Weibull e outros, que avaliam as informações fornecidas pelo teste da AME na descrição da produção cumulativa de metano durante o ensaio de biodigestão anaeróbia. Através da obtenção de funções sigmoidais e suas derivadas, são obtidos parâmetros que descrevem o progresso da produção de gás metano durante o processo de biodigestão anaeróbia (FLORENTINO et al., 2010). As três fases da curva de produção de metano podem ser descritas pelos parâmetros de máxima taxa de produção (R_m), sendo definida pela tangente no ponto de inflexão da derivada da curva sigmóide obtida pelo modelo, o tempo de fase lag (λ), definida como o ponto no eixo “x” que intercepta a tangente da máxima taxa de produção, e a assíntota como o máximo potencial de produção (P) atingido durante o processo (WANG; WAN, 2009; ZWIETERING et al., 1990).

A equação de Gompertz modificada é apresentada pela Equação 1 (KHANAL et al., 2003).

$$H = P \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

em que “H” é o volume de metano gerado (mL) em função do tempo “t” (h), “P” é a produção máxima de metano no ensaio (mL), “ R_m ” é a taxa máxima de produção de metano (mL/h) e “ λ ” é a fase lag da produção de metano (h).

3.2 Efluente da indústria de laticínios

A fim de atender a demanda pela produção de alimentos associado ao crescente aumento populacional, indústrias alimentícias fazem uso do desenvolvimento tecnológico para produzirem mais em menos tempo. Como forma de maximizar o lucro e gerar produtos com maior valor agregado, as indústrias de produtos lácteos utilizam de várias alternativas para

transformar o leite, considerada a sexta matéria prima mais importante da agropecuária brasileira (EMPRAPA, 2015), em demais produtos como queijos, requeijão, bebidas lácteas, entre outros.

Associado ao aumento da produção industrial, há o aumento da geração de efluentes industriais. A região sul de Minas Gerais apresenta um número significativo de laticínios com elevada geração de águas residuárias, sendo a maior parte destinada à alimentação animal (PARZIANELLO, 2011).

Para o destino adequado dos despejos industriais, as indústrias de produtos lácteos devem possuir um programa racional do controle de seus efluentes com o objetivo de evitar problemas relacionados à poluição. No entanto, os resíduos de origem animal apresentam alto valor energético, podendo, assim, obter uma maneira adequada de seu aproveitamento, reduzindo os custos de produção e minimização dos impactos ambientais ligados ao descarte destes dejetos (COSTA, 2009). A realização da biodigestão anaeróbia é uma alternativa viável para o aproveitamento energético do soro de leite.

As indústrias de laticínios geram uma elevada quantidade de águas residuárias, sendo gerados, aproximadamente, 3 a 6 litros de efluente por litro de leite processado (DOMINGUES et al., 2015). Os despejos industriais da indústria de produtos lácteos são produzidos a partir da água de lavagem, contendo detergentes e desinfetantes, da limpeza e sanitização de tanques e dutos de leite, equipamentos de ordenha e lavagem dos silos, análises do laboratório do controle de qualidade, poeiras e areia removidos da lavagem de pisos, resíduos de lubrificantes utilizados em equipamentos e a partir de subprodutos como soro de leite, queijo e processo de fabricação de sorvetes.

A água residual da indústria de produtos lácteos trata-se de um efluente rico em nutrientes e moléculas orgânicas que possuem baixo coeficiente de biodegradabilidade devido à alta concentração de lipídeos, o que os torna uma ameaça ao meio ambiente (CAMMAROTA; FREIRE, 2006). A carga de compostos orgânicos presentes no efluente de uma indústria de laticínios se dá pela determinação da quantidade de gorduras, lactose e proteínas. De acordo com o processo empregado, bem como o estado da matéria prima utilizada, a relação entre essas substâncias pode ser extremamente variável, o que aliado à temperatura, a suscetibilidade ao tratamento biológico é afetada (JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI; DEBOWSKI, 2008).

Processos de tratamentos aeróbios apresentam limitada aplicação para esse tipo de efluente devido a elevada carga orgânica, limitações de transferência de oxigênio, alta demanda energética pelo suprimento de oxigênio, produção de lodo acentuada e dificuldades na

sedimentação de sólidos (ADULKAR; RATHOD, 2014; KARADAG et al., 2015).

Nas últimas décadas, o tratamento anaeróbio empregando reatores tem se tornado mais atrativo em relação aos processos aeróbios tradicionais, devido a elevada produção de biogás, menor geração de lodo e biomassa, menor área requerida e menor demanda energética. Entretanto, a grande quantidade de lipídeos prejudica o tratamento anaeróbio devido a flotação de camadas de espuma de gordura na superfície dos reatores e da solidificação desses lipídeos a baixas temperaturas, levando ao entupimento e geração de odores desagradáveis (MENDES; PEREIRA; CASTRO, 2006).

Parâmetros físico-químicos característicos de águas residuárias de produtos lácteos presentes na literatura são evidenciados na Tabela 2 (MENDES, 2004).

Tabela 2 - Caracterização do efluente de uma indústria de produtos lácteos.

Características	Média	Faixa
DBO ₅ (mg/L)	2.300	40 – 48.000
DQO (mg/L)	4.500	80 – 95.000
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)	2.450	135 – 85.000
Sólidos em suspensão (mg/L)	816	24 – 4.500
Sólidos voláteis totais (mg/L)	1.093	6 – 5.360
Temperatura (°C)	32	18 – 52
Nitrogênio (mg/L)	56	15 – 180
Fósforo (mg/L)	33	12 – 132

Fonte: Adaptado de MENDES, 2004.

A fração de lipídeos compreende os óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres o que juntamente com as proteínas, compõem os principais compostos orgânicos presentes em águas residuárias (METCALF; EDDY, 2016). Dano ambiental como a formação de filmes de óleo nas superfícies aquáticas, impedindo a difusão de oxigênio do ar para o meio, promovendo a

mortandade da vida aquática, é apenas um dos problemas ambientais associados.

A Tabela 3 apresenta os valores da concentração de lipídeos em águas residuárias e suas principais fontes de geração.

Tabela 3 - Concentração de lipídeos em águas residuárias e suas principais fontes de geração.

Efluentes	Concentração de Lipídeos (mg/L)
Restaurantes	98
Doméstico	40 – 100
Matadouros	Acima de 500
Sorvetes	845
Laticínios	4.680
Óleos comestíveis	16.000

Fonte: Adaptado de MENDES, 2004.

Em águas residuárias, os lipídeos se encontram, preferencialmente, na forma de triacilgliceróis, apresentando uma pequena parte na forma de ácidos graxos livres de cadeia longa (AGCL), com destaque para os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico (QUÉMÉNUER; MARTY, 1994).

Nos processos de biodigestão anaeróbia, a alta concentração de lipídeo na forma de triacilglicerol, necessita ser, inicialmente, hidrolisada para que possa ser degradada pelas bactérias e arqueas metanogênicas, uma vez que o processo de biodigestão anaeróbia é lento e limitado pela liberação de ácidos graxos biodegradáveis pelos micro-organismos específicos com atividade lipolítica (DUEHOLM; ANDREASEN; NIELSEN, 2001).

O alto teor de lipídeos presentes nos efluentes, cerca de 30 – 40% da matéria orgânica total, estimularam o crescimento de micro-organismos filamentosos, auxiliando a remoção de nutrientes do meio, como o nitrogênio e o fósforo, e, conseqüentemente, a inibição de crescimento das bactérias e arqueas metanogênicas, promovendo a sustentação do lodo anaeróbio formado devido à redução de formação de grânulos de lodos maiores no meio reacional (DUEHOLM; ANDREASEN; NIELSEN, 2001; LIU et al., 2003).

3.3 Problemas relacionados ao tratamento anaeróbio de efluentes com alto teor de lipídeos

A hidrólise de lipídeos, etapa limitante no processo de biodigestão anaeróbia, se faz

necessária devido ao baixo consumo de AGCL pelas bactérias responsáveis pela biodigestão (QUÉMÉNUER; MARTY, 1994) e a necessidade de formação e acúmulo de uma pequena concentração de gás hidrogênio (H_2), formado nas reações de encurtamento da cadeia carbônica dos AGCL, capaz de afetar o equilíbrio das reações de decomposição dos AGCL que são termodinamicamente desfavoráveis (CHERNICHARO, 2007; METCALF; EDDY, 2016).

O acúmulo de AGCL causam problemas na biodigestão anaeróbia como toxicidade a micro-organismos acetogênicos e metanogênicos (METCALF; EDDY, 2016) e a formação de espumas no meio reacional, devido ao acúmulo de ácidos graxos não biodegradados (SALMINEN; RINTALA, 2002).

A fim de reduzir a toxicidade dos ácidos graxos, substâncias como colesterol, a albumina e a goma formam complexos que competem com os ácidos graxos na adsorção na parede celular. Outras substâncias como a bentonina, devido ao seu poder flocculante, e o cálcio, capaz de reagir com os ácidos graxos formando precipitados, podem prevenir a inibição dos ácidos sobre os micro-organismos. Os íons cálcio reduzem a fase de adaptação dos micro-organismos ao meio reacional, devido a formação de compostos insolúveis Ca-AGCL, o que reduz o efeito de inibição resultante da redução da concentração de AGCL, causando um aumento do rendimento de produção de biogás (CH_4) (MENDES, 2004).

Em concentrações milimolares, os AGCL causam a flotação da biomassa pela má formação dos grânulos de lodo, decorrente da dificuldade de liberação de gases produzidos na biodigestão anaeróbia (METCALF; EDDY, 2016).

Os AGCL são responsáveis, também, pelo decréscimo da concentração de trifosfato de adenosina (ATP), molécula responsável pelo fornecimento de energia as células microbianas (MENDES, 2004). Em estudo realizado por Perle et al. (1995), a inibição das atividades fisiológicas microbianas, em termos de produção de biogás, é bastante acentuada para efluentes contendo 100 mg/L de lipídeos. Efluentes que apresentam concentração de lipídeos superiores a 500 mg/L a produção de gás metano foi nula (Tabela 4).

Em estudo da influência das proteínas na atividade celular, as culturas anaeróbias pré-aclimatadas em caseína e ácidos oleico, principal proteína e AGCL presente nos efluentes industriais, respectivamente, não apresentaram dificuldades na degradação dos compostos orgânicos e no comprometimento das atividades fisiológicas, fato não verificado utilizando culturas não aclimatadas (PERLE; KIMCHIE; SHELEF, 1995).

Tabela 4 - Influência da concentração de lipídeos na biodigestão anaeróbia.

Concentração de lipídeos (mg/L)	Concentração de ATP nas células anaeróbias (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
1.000	7,24	0
1.500	5,68	0

Fonte: Adaptado de MENDES, 2004.

3.4 Pré-tratamento enzimático de efluentes com elevado teor de lipídeos

Como alternativa aos processos de tratamento biológico de águas residuárias convencionais, a primeira ideia de utilização de enzimas atuando na conversão da matéria orgânica em despejos industriais foi proposta em 1930 (AITKEN, 1993). Porém, apenas a partir dos anos 2000 pesquisas envolvendo a utilização de enzimas de fontes animais, vegetais e microbianas vem sendo desenvolvidas, despertando grande interesse de pesquisa (MERLIN CHRISTY; DIVYA; GOPINATH; 2014). Avanços no desenvolvimento da biotecnologia contribuíram para tal, permitindo o desenvolvimento de alternativas frente aos problemas associados ao alto teor de carga lipídica presente nos efluentes industriais e suas complicações perante a aplicação de sistemas de tratamento convencionais, devido ao desenvolvimento de técnicas de produção de enzimas economicamente viáveis (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; MERLIN CHRISTY; DIVYA; GOPINATH; 2014).

As enzimas encontram-se entre os biocatalisadores mais importantes utilizados nas reações químicas devido a sua capacidade de conversão utilizando um amplo espectro de substratos, além de fatores como alta estabilidade entre extremos de pH, temperatura e solventes orgânicos (AARTHY et al., 2014; CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

A utilização de enzimas no tratamento de águas residuárias apresenta vantagens potenciais como a degradação de compostos recalcitrantes, presentes cada vez em maiores

quantidades nos despejos industriais; crescente reconhecimento da capacidade das enzimas para atuar sobre poluentes específicos durante o tratamento; simplicidade de aplicação e facilidade no controle do processo, dispensando etapas como a aclimatação da biomassa e eficiente aplicação em processos que apresentam baixa ou alta concentração de poluentes (MERLIN CHRISTY; DIVYA; GOPINATH, 2014).

A atuação de enzimas sobre diversos tipos de substratos, como os efluentes gerados pelas indústrias têxtil, petrolífera, derivados de celulose e alimentícias em geral vêm sendo estudados, comprovando o potencial de tratamento apresentado pelo uso de biocatalisadores enzimáticos como parte integrante do sistema de tratamento, vindo de encontro com a forte tendência governamental em intensificar as restrições à poluição ambiental.

O emprego de enzimas lipolíticas no pré-tratamento de efluentes contendo elevados teores de lipídeos vem aumentando, apresentando resultados promissores na conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos livres, maximizando o processo de produção de biogás e a remoção de Demanda Química de Oxigênio (DQO) presente nos despejos industriais (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

A utilização de lipases comerciais imobilizadas no tratamento de águas residuárias revelaram resultados promissores na hidrólise de matéria orgânica rica em óleos e gorduras (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; MENG et al., 2015). Entretanto, devido ao elevado custo de produção, associados as etapas onerosas de extração e purificação das enzimas, o emprego frente ao tratamento de águas residuárias se torna inviável, sendo necessário o uso de preparações enzimáticas de baixo custo (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

3.5 Lipases

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são definidas como um grupo de enzimas hidrolíticas responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações éster – carboxílicas de acilgliceróis em ácidos graxos e glicerol como produtos da reação (ARAÚJO et al., 2016), podendo ser classificadas como enzimas intracelulares e extracelulares (GOG et al., 2012).

Lipases extracelulares necessitam do emprego de etapas de separação em relação ao meio o qual foi produzida para posterior realização da etapa de purificação, já as lipases intracelulares permanecem aderidas no interior ou na parede das células em que foram produzidas, dispensando tais etapas (AARTHY et al., 2014).

Segundo Masse et al. (2001), o emprego de lipases no tratamento de resíduos industriais

representa um campo de grande potencial, seja na biodegradação de plásticos, seja na prevenção ou limpeza de filmes gordurosos ou no pré-tratamento de efluentes que apresentam elevada carga lipídica, sendo esta última a aplicação objetivo do presente trabalho.

Dependendo da fonte de produção, as lipases podem apresentar massa molecular variando de 19 a 75 kDa, com atividade em meios em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas de 25°C a 70°C. Normalmente, as lipases são estáveis em soluções aquosas em pH neutro e temperatura ambiente. Estudos apontam atividade enzimática ótima na faixa de temperatura entre 30°C e 40°C e pH ótimo entre 7,5 a 8,0, variando de acordo com sua origem (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

As lipases podem ser obtidas a partir de fontes vegetais, animais e microbianas. As lipases provenientes de micro-organismos se destacam por serem mais estáveis, puras e apresentarem propriedades mais diversificadas em comparação com as lipases provenientes de células animais ou vegetais, abrangendo maior gama de aplicação. A elevada estabilidade apresentada pelas lipases microbianas está relacionada à produção de lipases extracelulares, em sua maioria, facilitando os processos de extração e purificação (KAMINI et al., 2014). Fatores como o fácil controle das condições de cultivo e o rápido crescimento celular viabilizam a aplicação de enzimas dessa fonte em escala industrial (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

3.5.1 Hidrólise enzimática de lipídeos

As lipases apresentam elevada versatilidade podendo catalisar uma série de diferentes reações sob diversos substratos. A Figura 2 apresenta os principais tipos de reações catalisadas pelas lipases.

Na presença de meio aquoso ou utilizando-se de solvente orgânico, além de clivar as ligações éster de triacilgliceróis, consumindo moléculas de água no processo de hidrólise, sob condições microaquosas, as lipases podem catalisar a reação reversa, como a formação de ligações éster a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Ambos os processos podem ser combinados numa sequência lógica resultando em reações de interesterificação, caracterizadas pelas reações de acidólise, alcoólise e transesterificação, sendo diretamente dependente dos reagentes de partida utilizados (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

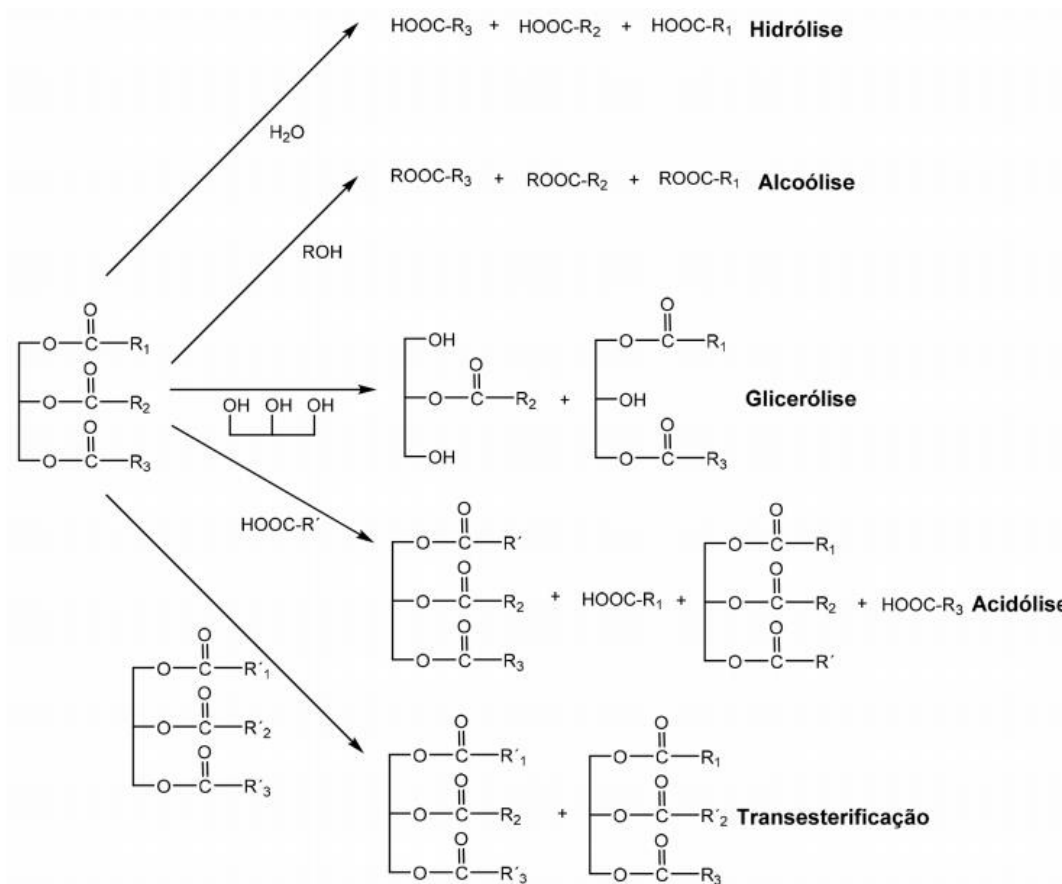


Figura 2 - Reações catalisadas pelas lipases.

Fonte: CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016.

A reação de hidrólise promovida pelo processo de clivagem sequencial dos grupos acila presentes nos triglicerídeos, liberando glicerol e ácidos graxos, é complexa, ocorrendo em vários estágios simultâneos com velocidades diferentes. Tanto em reações de hidrólise química, bem como em reações de hidrólise enzimática, num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeos, água, glicerol e ácidos graxos. Os triglicerídeos são convertidos a diacilgliceróis e monoacilgliceróis, onde serão convertidos a glicerol e ácidos graxos (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2013). A Figura 3, apresenta de forma simplificada o processo de hidrólise.

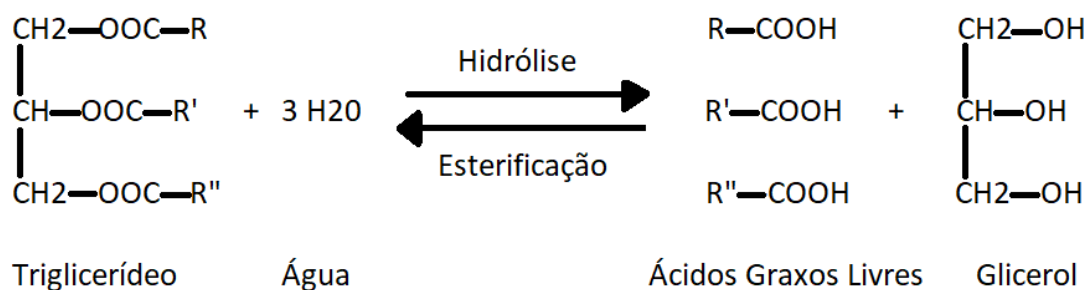


Figura 3 - Representação da hidrólise de triglicerídeos.

Fonte: Do autor.

Lipases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono, tem sido definidas como carboxilesterases, enquanto que as enzimas que hidrolisam acilgliceróis com menos de 10 átomos de carbono são definidas, genericamente, como esterases (AARTHY et al., 2014; CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). Lipases e esterases também apresentam diferenças pelas suas especificidades preferenciais. Os lipídeos contendo triacilgliceróis apresentam-se como os substratos naturais para as lipases, enquanto que as esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular. Ambos os substratos podem ser hidrolisados pelas lipases, enquanto que o inverso não é verdadeiro (BROCKMAN, 1984).

3.5.2 Fatores que influenciam a hidrólise enzimática de lipídeos

As enzimas lipolíticas responsáveis pelo processo hidrólise apresentam desempenho enzimático diretamente associado a fatores como concentração de substrato, pH, temperatura, presença de agentes emulsificantes e íons:

- **Concentração de substrato:** em reações catalisadas por enzimas, a velocidade de uma reação é aumentada de acordo com a concentração de substrato presente no meio reacional. Altas concentrações de substrato ocasionam a saturação pelo substrato de todos os sítios de ligação disponíveis na enzima, atingindo uma velocidade máxima de reação (DORAN, 1995). A atuação de lipases em sistemas heterogêneos é proporcional a concentração de emulsão. Baixas concentrações conduzem a um decréscimo de adsorção de lipase atuando na interface água/óleo, reduzindo a sua atividade hidrolítica, o que não ocorre em sistemas que apresentam elevadas concentrações de emulsão (MENDES, 2004).

- **pH:** enzimas são biocatalisadores que possuem pH característico de atuação em que sua atividade é máxima, denominado pH ótimo enzimático. A maioria das enzimas apresentam pH ótimo próximos a neutralidade, valores acima ou abaixo resultam no decréscimo da atividade da enzima. O pH ótimo está associado ao tipo de substrato, estado de pureza da enzima, tampão e métodos de ensaio. Quando submetidos a mudanças de pH, o caráter iônico dos grupos carboxílicos e amino presentes nas enzimas são afetados, ocorrendo interferências em seu sítio catalítico e, conseqüentemente, conformidades a estrutura da enzima (DONG; WANG; ZHENG, 2010). Segundo Sharma et al. (2013), o pH interfere na estabilidade da interface água/óleo do meio reacional, uma vez que está diretamente associado a cargas elétricas, ocasionando maior exposição do substrato ao sítio ativo da enzima, favorecendo a sua atividade.
- **Temperatura:** assim como apresentado pela concentração de substrato, o aumento da temperatura do meio reacional resulta no aumento da velocidade de reação até atingir a velocidade máxima de reação. Maior energia cinética é fornecida às moléculas de enzima e substrato com o aumento da temperatura, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. Reações de hidrólise enzimática apresentam um acréscimo das taxas de hidrólise em temperaturas mais elevadas devido as moléculas de substrato adquirirem maior energia de ativação para superar o estado transiente da reação de hidrólise parcial (WANG et al., 2010). Segundo Doran (1995), a elevação adicional da temperatura do sistema resulta na redução da velocidade de reação, em consequência da desnaturação enzimática induzida pela temperatura. A desnaturação da enzima devido ao aumento da temperatura, além da temperatura ótima, se dá devido a maior energia fornecida, interferindo nas forças de interações fracas que mantém a estrutura terciária da enzima (DORAN, 1995).
- **Agentes Emulsificantes:** constituídos por moléculas anfífilas, os agentes emulsificantes são responsáveis pela formação de um filme molecular ordenado na interface água/óleo, capaz de reduzir a tensão interfacial e superficial, resultando em uma melhor distribuição de substratos aos sítios ativos das lipases, o que gera um aumento da atividade lipolítica das enzimas. Devido ao fato das gorduras serem insolúveis em água, a emulsificação facilita o processo de hidrólise pela ação da lipase, aumentando muito a superfície do substrato exposto a enzima. Apesar dos efeitos da utilização de agentes emulsificantes em lipases serem pouco estudados, em processos biotecnológicos, a goma arábica é o agente tensoativo mais utilizado, conduzindo a elevadas atividades lipolíticas. Valores de atividade enzimática

só são comparáveis quando empregados os mesmos tipos de agentes emulsificantes e em mesma concentração para a realização de todos os ensaios experimentais, uma vez que a determinação da atividade lipolítica varia em função do tipo de agente tensoativo empregado e de sua concentração (MENDES, 2004).

- **Efeito dos íons:** os sais apresentam influência direta na ação hidrolítica exercida pelas lipases, podendo maximizá-la ou minimizá-la de acordo com o tipo de sal utilizado e sua concentração. Em estudo realizado por Macedo (1995), as lipases de *Penicillium roquefortii* apresentaram um incremento de atividade lipolítica na presença de íons K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Mn^{2+} , até a concentração de 1 mM. Já na presença de íons Fe^{3+} , os valores de atividade lipolítica reduziram drasticamente. Segundo Sharon et al. (1998), os metais pesados e os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} inibem a ação hidrolítica exercida pelas lipases pois a presença desses íons podem causar a alteração da conformação dos sítios ativos das lipases.

3.6 Produção de células íntegras na hidrólise de efluentes com elevado teor de lipídeos

Os fungos filamentosos são fontes de lipases que apresentam os resultados de maior potencial quando comparados as fontes animais e vegetais, porém a maior parte dos micro-organismos produzem lipases extracelulares, o que requer etapas posteriores de separação e purificação, encarecendo o seu processo de obtenção (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). Os processos de separação, purificação e imobilização da lipase extracelular normalmente correspondem a mais de 70% do custo final da lipase (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

Alternativas a fim de minimizar os custos de produção vem sendo desenvolvidas nos últimos anos como a aplicação de genética molecular, produzindo lipases que apresentam alta seletividade e estabilidade, imobilização em suportes sólidos visando à reutilização em processos em batelada ou ainda a utilização de células íntegras de fungos filamentos produtores de lipases, dispensando gastos advindos dos processos de extração e purificação. Entretanto, esta última requer a utilização de micro-organismos produtores de lipases intracelulares (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

A etapa de produção de células íntegras é realizada mediante cultivo celular, obtendo enzimas aderidas no interior das células como consequência natural do crescimento celular (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). Utilizando-se de técnica de fermentação submersa, as células dos fungos filamentosos *P. citrinum* apresentam um crescimento em forma de “pellets”, caracterizadas por massas esféricas de hifas que apresentam estrutura interna

variável, compactas e densas (ROMERO; BAIGORI; PERA, 2007). Segundo Papagianni (2004), os fungos filamentosos são micro-organismos morfológicamente complexos, exibindo diferentes formas estruturais ao decorrer de todo seu ciclo de vida, a densidade das hifas apresenta importância para o processo de difusão dos nutrientes e oxigênio no interior da biomassa micelial, apresentando consequentes efeitos acerca da forma de crescimento da biomassa, particularmente no centro dos “pellets”.

A estrutura celular na forma de “pellets” age como uma matriz natural, responsável por proteger as enzimas da ação de agentes externos, de forma análoga ao apresentado pelas matrizes utilizadas em processos de imobilização enzimática (ROMERO; BAIGORI; PERA, 2007). Ao final do processo de cultivo celular e separação da biomassa fúngica do meio de cultivo por meio de filtração, a biomassa adquire um aspecto filamentosos e de elevada resistência mecânica, explicado pela rigidez da parede celular dos fungos filamentosos (PAPAGIANNI, 2004).

A literatura cita diversos artigos sobre a produção células íntegras com elevada atividade lipolítica produzidas por diferentes espécies do gênero *Mucor* sp. (ANDRADE et al., 2014), *Geotrichum* sp. (LOO et al., 2014), *Rhizopus* sp. (WANG et al., 2015) e *Aspergillus* sp. (GULDHE et al., 2016), para a aplicação em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. No entanto, com relação a utilização de células íntegras de fungos filamentosos visando o pré-tratamento de despejos industriais contendo elevados teores de lipídeos, não existe relato na literatura nacional, apesar da potencialidade desse biocatalisador de baixo custo em reações de hidrólise de óleos e gorduras.

3.7 Imobilização de células íntegras

A imobilização de células íntegras é definida como um confinamento físico em região definida capaz de manter a atividade catalítica celular tanto em processos contínuos e descontínuos (COVIZZI et al., 2007). O processo de adesão celular dos micro-organismos aos suportes sólidos se dá por meio de ligações naturais físico-químicas (GUPTA, 2016).

Vantagens como o reaproveitamento do material biológico, devido a utilização de suportes sólidos inertes com alta resistência mecânica, aumento da estabilidade enzimática e a reutilização em processos contínuos e descontínuos são alguns dos principais benefícios oferecidos pela imobilização celular (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Entretanto, o uso de células imobilizadas apresenta algumas desvantagens como o rompimento da matriz

devido ao crescimento celular e limitações de transferência de massa e oxigênio, afetando a fisiologia e cinética do crescimento celular. (WANG et al., 2005).

Em processos biotecnológicos, as técnicas de adsorção em suportes inertes, encapsulamento em glóbulos, aprisionamento em matrizes poliméricas e ligação covalente, cruzada ou iônica em suportes previamente ativados, são as principais técnicas de imobilização celular, normalmente aplicadas em processos de biotransformação (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). A imobilização celular em suportes inertes é muito utilizada devido a sua simplicidade, baixo custo, fácil manipulação e grande diversidade de suportes existentes. A escolha do suporte depende de suas propriedades físicas e químicas, das características do material biológico e das condições de uso do sistema imobilizado, não existindo um suporte universal aplicável a qualquer processo e nem um método geral de imobilização (KILONZO; MARGARITIS; BERGOUGBOU, 2011).

A escolha de uma matriz adequada para a imobilização celular é um fator de extrema relevância visando a obtenção do produto desejado. Para cada micro-organismo e metabólito faz-se necessário a realização de uma análise distinta (SILVA et al., 2006). Fatores como o tamanho do poro, a porosidade e o grau de hidrofobicidade da matriz interferem na intensidade da adesão celular (COVIZZI et al., 2007).

Geralmente, processos de imobilização celular envolvendo fungos filamentosos requerem o uso de suportes porosos, visto que ocorre a adesão das células microbianas na superfície do suporte. Em suportes que apresentam poros de dimensões elevadas, as células microbianas em crescimento penetram no suporte, preenchendo todo o seu espaço interno (COVIZZI et al., 2007). Dentre os suportes porosos, as espumas de poliuretano e a bucha vegetal se destacam, apresentando grande relevância como suportes de imobilização, oferecendo suporte biológico e oxigenação ideal para o crescimento de micro-organismos (JIN et al., 2009; ANDRADE et al., 2012).

Característica como grande área superficial com interstícios para o crescimento celular, leveza adequada para o crescimento dos fungos, porosidade uniforme garantindo a troca gasosa, estabilidade mecânica, química, térmica e biológica, resistência à degradação enzimática e baixo custo comercial, fazem das espumas de poliuretano suportes de fácil imobilização, garantindo sua viabilidade em processos industriais (SOARES, 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 *Micro-organismo*

Para produção das células íntegras com elevada atividade lipolítica foi utilizado o fungo filamentosso *Penicillium citrinum* URM 4186, adquirido da Micoteca da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco). O fungo foi conservado em geladeira (4°C) em meio sólido PDA (Difco®) e repicado a cada 4 meses.

4.1.2 *Suporte de imobilização*

Para imobilização das células íntegras empregou-se espumas de poliuretano (Esfrebon®) cortadas em cubos de 6 mm. As espumas foram previamente tratadas em solução HNO₃ 0,1 M por 2 horas e lavadas em água até pH neutro.

4.1.3 *Meio de cultura*

Para cultivo e imobilização das células íntegras o meio de cultura líquido foi composto por diferentes fontes de carbono (óleo de oliva comercial Carbonell®, óleo de soja comercial Liza®, óleo de canola comercial Liza® e óleo de girassol comercial Liza®), fontes de nitrogênio (peptona de soja Himedia®, peptona bacteriológica Kasvi® e peptona de soja Himedia® mais extrato de levedura), NaNO₃ 1 g/L (Synth®), KH₂PO₄ 1 g/L (Synth®) e MgSO₄·7H₂O 0,5 g/L (Synth®), o qual foi devidamente autoclavado a 121°C por 20 minutos.

4.1.4 *Efluentes*

Como fonte de substrato, foram utilizados soro de leite sintético em pó (Laticínios Porto Alegre®), contendo 2,7 g de proteínas, 15,3 g de carboidratos e 0,2 g de gorduras totais (valores exibidos no rótulo da embalagem para cada 20 g de soro de leite em pó), e água residuária da indústria de laticínios Bandeira®, localizada no município de Bandeira do Sul – MG,

armazenada em geladeira (4°C) a fim de preservar sua autodegradação, verificando-a por meio de análise de DQO a cada 2 meses.

4.1.5 Lodo Anaeróbio

Os testes de biodegradabilidade anaeróbia foram efetuados mediante a utilização do lodo granular anaeróbio da avícola Dacar[®], sediada no município de Tietê-SP, armazenado em frasco âmbar a temperatura ambiente.

4.2 Procedimento experimental

A Figura 4 apresenta o fluxograma de execução do presente trabalho, sendo dividido em 3 etapas. Como primeira etapa, foram levados em conta o cultivo de células íntegras livres de *P. citrinum*, determinando as melhores condições nutricionais e físico-químicas do cultivo celular, a fim de que se tenha um aumento da formação de biomassa e produção de lipase ligada ao micélio. Com a determinação das melhores condições de cultivo celular, procedeu-se a etapa de testes iniciais de hidrólise enzimática, avaliando, primeiramente, a influência da concentração de DQO e do carregamento enzimático na hidrólise do soro de leite sintético como fonte de substrato para posterior avaliação do desempenho lipolítico das células íntegras livres e imobilizadas em três diferentes valores de pH do meio reacional. Como terceira e última etapa, pode-se avaliar o potencial de produção de gás metano e determinar o potencial de biodegradabilidade do efluente industrial para três diferentes condições de ensaio.

4.3 Metodologia experimental

4.3.1 Preparação e imobilização das células íntegras

O preparo e imobilização das células íntegras foram realizados conforme metodologia descrito por Andrade et al. (2012). Para o preparo das células íntegras livres, em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura foi inoculada uma suspensão de 1×10^7 esporos do fungo em água estéril, os quais foram incubados em incubadora orbital *shaker* a uma temperatura de 30°C e 170 rpm por um período máximo de 96h. Para o preparo das células

íntegras imobilizadas, ao meio de cultura foram adicionados 0,6 g de cubos de poliuretano. Em ambos os processos, a biomassa obtida (livre ou imobilizada) foi separada do meio de cultura mediante filtração a vácuo, lavada com água destilada e acetona e seca sob vácuo por um período máximo de 48 horas.

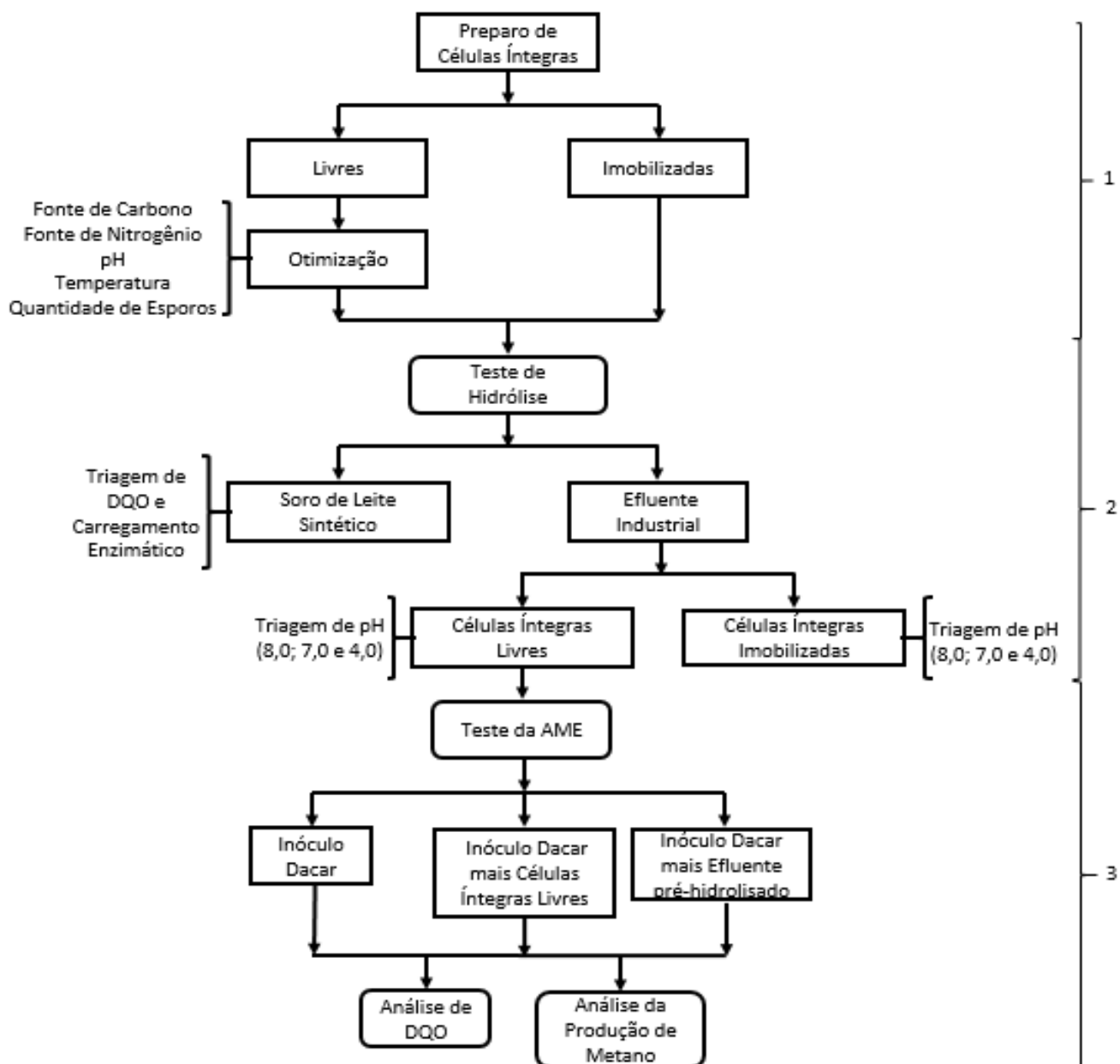


Figura 4 - Fluxograma de blocos referente ao procedimento de execução do projeto de pesquisa.

Fonte: Do autor.

4.3.2 *Influência de parâmetros nutricionais e físico-químicos na produção de lipase ligada ao micélio das células íntegras livres*

A fim de aumentar a produção de lipase ligada ao micélio nas células íntegras de *P. citrinum*, foram investigados, em duplicata, a influência dos parâmetros nutricionais como fonte de carbono e nitrogênio e os parâmetros físico-químicos como pH e temperatura, além da influência da concentração de inóculo no meio de cultura, dados como precursores da formação de biomassa e produção de lipase ligada ao micélio (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). Foram avaliados como fonte de carbono os óleos de oliva, soja, canola e girassol, ambos adquiridos em mercado local e utilizados na concentração de 30 g/L; como fonte de nitrogênio investigou-se peptona bacteriológica (70g/L), mistura de peptona de soja (35g/L) e extrato de levedura (35g/L) e peptona de soja (35, 50 e 70 g/L); o pH do meio de cultura foi testado na faixa entre 5,0 a 8,0 com um incremento de 0,5, através da adição de HCl ou NaOH concentrados; a faixa de temperatura avaliada foi de 30 a 40°C, com um incremento de 10°C e quantidade de inóculo de 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos do fungo filamentososo /100 mL de meio de cultura foi investigada.

4.3.3 *Reações de hidrólise enzimática sob agitação em Shaker*

Os testes iniciais de hidrólise enzimática do efluente, contendo elevado teor de lipídeos, foram realizados com base na metodologia modificada descrita por Mendes et al. (2006). As reações foram realizadas em frascos Erlenmeyers[®] de 250 mL e em frascos do tipo Duran[®] de 500 mL. O meio reacional contendo o substrato (águas residuárias ou soro de leite sintético) em pH (4,0 *in natura*; 7 ou 8) previamente ajustado pela adição de NaOH concentrado foi adicionado aos frascos juntamente com quantidades “previstas” de células íntegras livres ou imobilizadas. A relação entre volume de substrato e massa de biocatalisador foi definida de acordo com os valores de atividade enzimática (U/g) fornecidos pelas células íntegras. As reações ocorreram sob agitação orbital (170 rpm) em *shaker* por um período máximo de 48 horas a 37°C. Alíquotas, em duplicata, de 2,5 g do meio reacional foram retiradas para quantificação dos ácidos graxos liberados através de titulação ácido base dos ácidos graxos formados utilizando como titulante solução de KOH 0,02M e fenolftaleína como indicador. O preparo do branco seguiu o mesmo procedimento descrito, porém na ausência de biocatalisador. A porcentagem de hidrólise foi calculada pela determinação da concentração de ácidos graxos

formados durante a reação de hidrólise dos triglicerídeos presentes no substrato, conforme Equação 2 (MENDES, 2004).

$$\%Hidrólise = \frac{(V_a - V_b) * M_{KOH} * 10^{-3} * M}{m * f} * 100 \quad (2)$$

em que V_a representa o volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_b representa o volume de KOH gasto na titulação do branco (mL), M_{KOH} representa a molaridade da solução de KOH utilizada no processo, M representa a massa molecular média dos ácidos graxos no soro de leite (g/mol), m representa a massa da amostra (g) e f representa a fração de lipídeo presente no meio reacional.

O cálculo da massa molecular média dos ácidos graxos (“ m ”) presentes no soro de leite sintético e no efluente foram estimados através da média ponderada de suas concentrações, determinados via análise cromatográfica realizada na Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP). As concentrações médias dos ácidos graxos encontrados para as duas condições são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição média de ácidos graxos presentes no soro de leite sintético laticínios Porto Alegre[®] e no efluente da indústria de produtos lácteos Bandeira[®].

Ácidos Graxos	Soro Sintético (%)	Efluente (%)
Caprílico (C _{8:0})	2,04	2,12
Cáprico (C _{10:0})	1,82	0,00
Láurico (C _{12:0})	5,69	11,35
Mirístico (C _{14:0})	12,09	9,32
Palmítico (C _{16:0})	33,71	33,13
Palmitoléico (C _{16:1})	3,12	0,00
Margárico (C _{17:0})	0,50	0,98
Estearico (C _{18:0})	12,19	31,06
Oleico (C _{18:1})	27,32	12,04
Linoleico (C _{18:2})	1,52	0,00
“M” calculado (g/mol)	256,92	257,05

Fonte: Do autor.

4.3.4 *Determinação do potencial de biodegradabilidade anaeróbia e produção de gás metano do efluente industrial*

Com o objetivo de avaliar o potencial de biodegradabilidade anaeróbia e produção de gás metano do efluente bruto e pós tratamento enzimático com células íntegras livres de *P. citrinum*, foram realizados seis ensaios de AME para três diferentes condições, conforme apresentados pela Tabela 6.

Tabela 6 - Constituição do meio reacional para realização do teste de atividade metanogênica específica (AME).

Teste de Atividade	Meio reacional
Metanogênica Específica	
1	Efluente industrial Bandeira [®] bruto e inóculo Dacar [®]
2	Efluente industrial Bandeira [®] bruto, células íntegras lipolíticas livres e inóculo Dacar [®]
3	Efluente industrial Bandeira [®] pré hidrolisado e inóculo Dacar [®]

Fonte: Do autor.

Os testes de atividade metanogênica específica (AME) foram realizados, em duplicata, em reatores tipo batelada compostos por frascos Duran[®] de 500 mL, apresentando 350 mL de meio em pH 7, mediante ajuste com solução alcalinizante NaOH 1M, e 106 mL de lodo anaeróbio Dacar[®], com um *headspace* de aproximadamente 44 mL. Os frascos foram inseridos em *shaker* sob agitação de 130 rpm e temperatura de 30°C, durante toda a realização do experimento. A parte superior do reator foi fechada hermeticamente, acoplado o *headspace* do reator ao sistema de medição de produção de metano.

A medição do volume de biogás produzido foi realizada de modo indireto, com um sistema composto por um frasco Duran[®] de 1.000 mL contendo solução de hidróxido de sódio (NaOH) a uma concentração de 15 g/L e uma proveta de 500 mL. O *headspace* de cada reator foi conectado ao frasco contendo a solução de NaOH de forma que todo o biogás produzido fosse direcionado e borbulhado nesta solução, precipitando todo o CO₂ produzido na forma de Na₂CO₃ (como produto da reação com a solução de NaOH), restando apenas CH₄ e traços de outros gases como constituintes do biogás formado.

Por fim, o frasco contendo a solução de NaOH foi conectado à proveta. À medida que o gás, um volume de NaOH era deslocado para uma proveta graduada, determinando-se assim indiretamente o volume de metano produzido. O sistema de coleta e quantificação de gás metano pode ser observado na Figura 5.

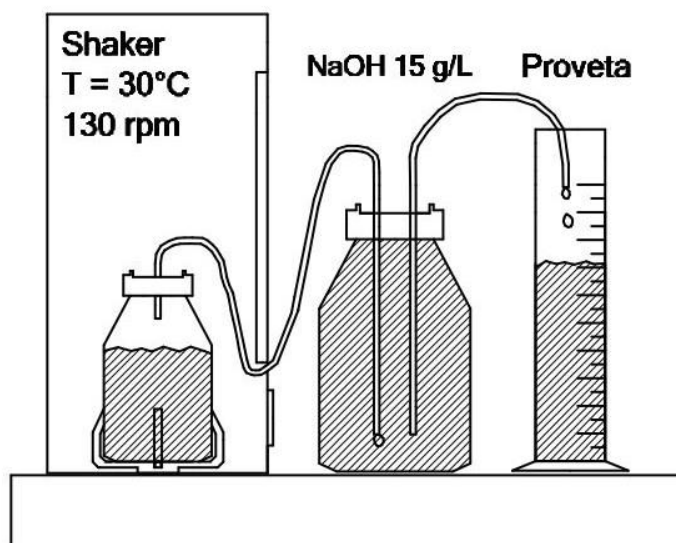


Figura 5 – Esquematização do sistema de coleta e quantificação de gás metano no ensaio de atividade metanogênica específica (AME).

Fonte: Do autor.

Com os resultados obtidos dos ensaios de AME, foi determinada a taxa máxima de produção e a produção máxima de gás metano, além da fase de adaptação dos micro-organismos no processo de biodigestão anaeróbia, para cada condição analisada.

Ao final do teste, alíquotas do meio reacional foram centrifugadas, por um período de 25 minutos a 4.000 rpm, sendo posteriormente submetidas as análises de DQO e pH. A remoção da matéria orgânica, quantificada como DQO, foi utilizada como parâmetro de avaliação do efeito do pré-tratamento enzimático do efluente com células íntegras lipolíticas, tendo o efluente bruto como controle na determinação do potencial de biodegradabilidade do efluente industrial.

4.4 Metodologia analítica

4.4.1 Determinação do teor de umidade das células íntegras

O teor de umidade das células íntegras, após a etapa de filtração a vácuo e secagem em dessecador, por um período máximo de 48 horas, pode ser calculado conforme Equação 3.

$$U_{amostra} = \frac{m_{úmida} - m_{seca}}{m_{úmida}} \times 100 \quad (3)$$

em que $U_{amostra}$ representa o teor de umidade das células íntegras (%), $m_{úmida}$ representa a massa de micélio após secagem em dessecador, contendo vácuo, sílica gel e pentóxido de fósforo (g) e m_{seca} representa a massa aferida de micélio após secagem em estufa a 103°C por um período de 24 horas (g).

4.4.2 Determinação da atividade hidrolítica das células íntegras

A atividade enzimática das células livres e imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Andrade et al. (2014). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de água destilada e goma arábica a 3% (m/v). Em frascos Erlenmeyer[®] de 125 mL foram adicionados 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) e 1 g de células imobilizadas (massa seca) ou 1,0 ml do caldo fermentado. Os frascos foram incubados a 37°C por 5 minutos, em banho termostaticado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de etanol e água destilada (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 4, sendo uma unidade de atividade definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades são expressas em µmol/g.min (U/g).

$$A(U) = \frac{(V_a - V_b) * M_{KOH} * 10^3}{t * m_{seca}} \quad (4)$$

em que V_a representa o volume de titulante gasto na titulação da amostra (mL), V_b representa o volume de titulante gasto na titulação do branco (mL), M_{KOH} representa a molaridade do titulante utilizado (mol/L), t representa o tempo de reação (min) e m_{seca} a quantidade de massa seca de biocatalisador utilizada durante a reação (g) ou a quantidade do caldo fermentado utilizado durante a reação (g).

4.4.3 *Determinação da concentração de ácidos graxos livres*

A análise de porcentagem de ácidos graxos livres foi realizada mediante metodologia descrita por AOAC (2003). Em Erlenmeyer[®] de 250 mL, foram adicionados 1 g de amostra do efluente hidrolisado e 10 mL de álcool etílico absoluto P.A. Em seguida, foi realizada titulação ácido base, utilizando solução de KOH (0,02 M) como titulante e indicador fenolftaleína, até a obtenção da coloração rósea do sistema. O cálculo da porcentagem de ácidos graxos é descrito conforme a Equação 5.

$$AGL (mM) = \frac{(V_a - V_b) \cdot N \cdot 10^3}{M} \quad (5)$$

em que V_a refere-se ao volume de solução de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_b refere-se ao volume de solução de KOH gasto na titulação do branco (mL), N refere-se a molaridade da solução de KOH (mol/L) e M a massa de amostra utilizada (g).

4.4.4 *Determinação da concentração de lipídeos*

Para a determinação do teor lipídico dos efluentes, fez-se o uso da metodologia padrão conforme descrita no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2012). Para tanto, a concentração de lipídeos foi quantificada via extração em Soxhlet, utilizando hexano como solvente extrator.

Um volume de amostra do efluente de 200 mL foi acidificado com solução concentrada de HCl, adicionando-se 5 mL de solução para cada 1.000 mL de amostra do efluente. Posteriormente, foi realizada a filtração a vácuo do efluente acidificado, utilizando-se um disco de tecido acoplado a um papel de filtro e uma camada de terra diatomácea. O material retido, composto pelo papel de filtro e a torta de diatomita, contendo toda a carga lipídica retida do

efluente, foi introduzido em cartucho de extração, previamente descontaminado e seco em estufa a 103°C por um período de 30 minutos, iniciando a etapa de extração com hexano por um período de 2 horas. Após resfriamento, o hexano contendo toda a carga lipídica foi introduzido em rotaevaporador a 20 rpm por um período de 4 horas. O solvente foi evaporado e o balão de destilação, contendo toda a carga lipídica, foi colocado em estufa a 103°C para secagem e aferição de sua massa.

A determinação da concentração de lipídeos presentes no efluente, pode então ser calculada pela diferença da massa aferida do balão de destilação contendo a carga lipídica seca do efluente e a massa aferida do balão de destilação vazio, dividido pelo volume de amostra do efluente utilizado, conforme descreve a Equação 6.

$$\text{Lipídeos} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{M_{\text{seco}} - M_{\text{vazio}}}{V_a} \quad (6)$$

em que M_{seco} refere-se a massa obtida do balão de destilação contendo a carga lipídica do efluente (mg), M_{vazio} refere-se a massa do balão de destilação vazio (mg) e V_a refere-se ao volume de amostra do efluente utilizado para determinação da concentração de lipídeos presentes no efluente (L).

4.4.5 Teor de sólidos e demanda química e oxigênio

A análise para a determinação do teor de sólidos e demanda química de oxigênio (DQO) foram realizadas conforme uso da metodologia padrão descrita no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação das condições ótimas de preparo das células íntegras livres

As células íntegras livres e imobilizadas foram preparadas a partir do cultivo em meio de cultura líquido, conforme descrito em 4.3.1. As células íntegras livres forneceram um crescimento celular médio de 18 ± 2 g/L de biomassa seca e atividade lipolítica média na biomassa de 88 ± 17 U/g e no filtrado $10,6 \pm 0,7$ U/mL. A fim de aumentar a produção de lipase ligada ao micélio, julgou-se necessário investigar a influência dos parâmetros nutricionais e físico-químicos na produção das células íntegras.

Fatores nutricionais e físico-químicos tais como adição de substratos lipídicos como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, presença de micronutrientes, pH, temperatura, agitação constante durante o cultivo celular e quantidade de inóculo são elementares para o crescimento microbiano e determinação das melhores condições da produção de enzimas de elevada atividade lipídica (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

Para tanto, foram estudados a influência dos parâmetros fonte de carbono (FC), fonte de nitrogênio (FN), pH, temperatura e concentração de inóculo do meio de cultura líquido. A seleção da melhor fonte de carbono para a produção de enzimas lipolíticas é específica para cada micro-organismo, variando desde a escolha de fonte de carbono simples como açúcares até a utilização de óleos, triacilgliceróis ou qualquer outro tipo de agente indutor como ácidos graxos. A produção de lipases a partir de micro-organismos independe da adição de substratos lipídicos presentes no meio de cultura. Entretanto, diversos estudos em literatura indicam que as fontes de carbono lipídicas são capazes de aumentar o nível de atividade lipolítica das enzimas obtidas, sendo consideradas essenciais para a obtenção de um alto rendimento em lipase (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

Inicialmente foram realizados cultivos, em duplicata, sob diferentes fontes de carbono (FC), fixando os demais parâmetros: FN peptona de soja 70g/L, pH 7,0, temperatura 30°C e quantidade de inóculo 1×10^6 esporos, medindo-se a atividade lipolítica e o crescimento celular ao final de 96h de cultivo, conforme descrito na seção 4.4.2. Os perfis de atividade enzimática, do filtrado e da biomassa, bem como o crescimento celular são mostrados na Figura 6.

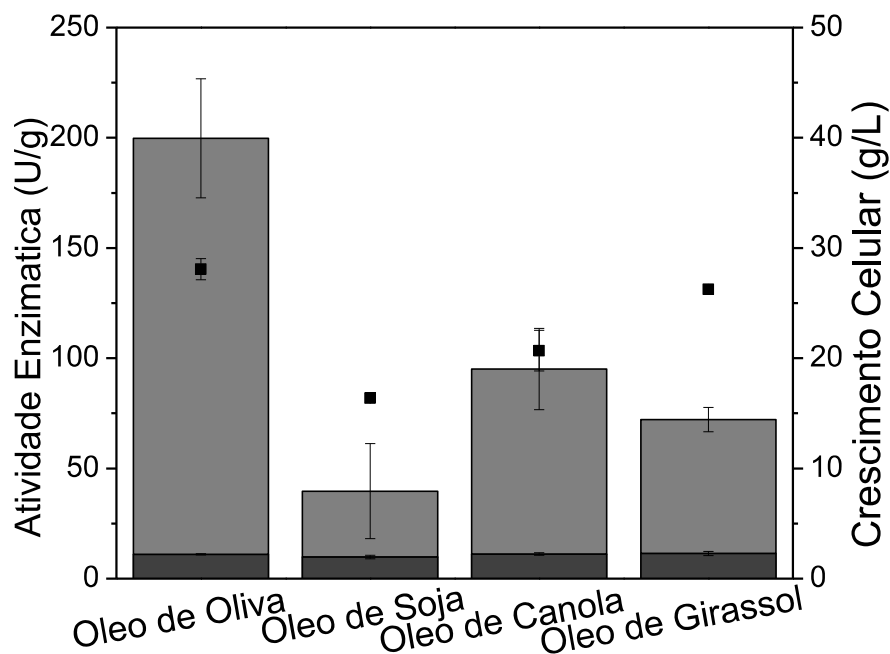


Figura 6 – Perfil de crescimento celular (■), atividade lipolítica do filtrado (■) e da biomassa (■) empregando diferentes fontes de carbono a 30 g/L no cultivo das células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum*. Condições de cultivo: FN peptona de soja 70g/L, pH 7,0, 30°C e 1×10^6 esporos.

Fonte: Do autor.

Em termos de crescimento celular, os óleos de oliva e girassol foram os que promoveram maior formação de biomassa, com valores de $28,1 \pm 0,9$ e $26,3 \pm 0,4$ g/L, respectivamente (Figura 6). No entanto, o mesmo comportamento não foi observado para a atividade enzimática da biomassa, visto que o óleo de oliva apresentou valor muito superior (199 ± 27 U/g), indicando que o crescimento celular mais expressivo não implica em maior atividade enzimática. Isso reforça a hipótese de que a composição do triglicerídeo influencia diretamente na produção de lipase ligada ao micélio.

Esse resultado corrobora com diversos estudos presentes na literatura sobre a otimização do meio e das condições de cultivo de micro-organismos, os quais relatam que os efeitos de diferentes óleos indutores na produção de lipase são causados pelos ácidos graxos presentes em sua composição, sendo o ácido oleico o principal responsável pela produção de enzimas de elevada atividade lipolítica, tendo a sua produção diretamente relacionada com a quantidade de ácido oleico presente em cada óleo (YANG et al., 2005; WANG et al., 2008; ZENG et al., 2006).

Yang et al. (2005) investigaram a influência de diferentes ácidos graxos como fonte de carbono na produção de lipases intracelulares de *R. arrhizus*, tendo o ácido oleico o melhor agente indutor. Andrade et al. (2004) avaliaram o efeito dos óleos vegetais de soja, de oliva, de linhaça e de castanha-do-pará, no cultivo de células íntegras de *Mucor circinelloides*, sobre o crescimento celular e a atividade lipolítica. Segundo os autores, todos os óleos utilizados como fonte de carbono foram benéficos ao crescimento celular e a atividade lipolítica das células cultivadas, valores máximos foram obtidos mediante a utilização de óleo de oliva na concentração de 30 g/L. Concentrações superiores a 30 g/L promoveram a inibição do crescimento celular, já o fornecimento pobre de nutrientes reduziu a taxa de produção de lipase em consequência da diminuição do crescimento celular. Ainda segundo os autores, a maximização da atividade lipolítica está relacionada à alta proporção de ácido oleico (70%) presente no óleo de oliva, sendo superior aos demais óleos indutores utilizados.

Sun et al. (2010) citam que diferentes óleos indutores resultam em composições variadas da membrana celular das células íntegras, influenciando diretamente na atividade catalítica e sua estabilidade operacional.

Em ambos os ensaios realizados, variando diferentes fontes de carbono, foram verificados valores baixos de atividade enzimática no filtrado, indicando a retenção da lipase ligada ao micélio.

Sendo o óleo de oliva a fonte de carbono que forneceu os melhores resultados em termos de atividade enzimática, o mesmo foi utilizado nos demais cultivos na concentração de 30 g/L. Fixando-se os demais parâmetros pH 7,0, temperatura 30°C e quantidade de inóculo 1×10^6 esporos, a variação da fonte de nitrogênio foi avaliada e os seguintes perfis de crescimento celular e de atividade lipolítica tanto do filtrado como da biomassa foram obtidos, conforme representados na Figura 7.

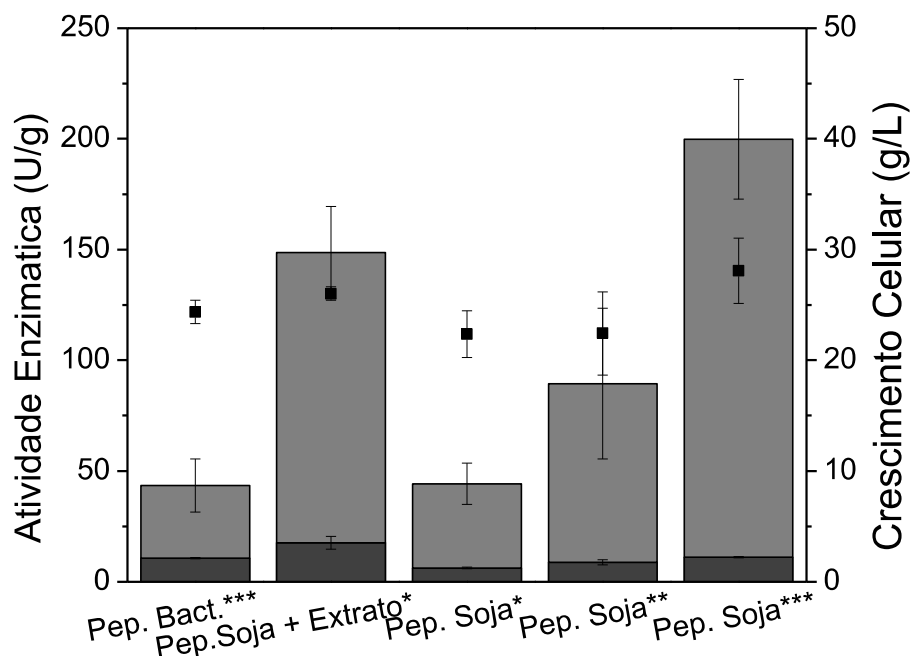


Figura 7 - Perfil de crescimento celular (■), atividade lipolítica do filtrado (■) e da biomassa (■) empregando diferentes fontes de nitrogênio no cultivo das células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum*. Condições de cultivo: FC óleo de oliva 30g/L, pH 7,0, 30°C, 1×10^6 esporos (*35 g/L, **50 g/L e ***70 g/L).

Fonte: Do autor.

Ao avaliar a influência da fonte de nitrogênio em diferentes concentrações, verificou-se na Figura 7 que ao final do cultivo celular, não foram observadas mudanças significativas em relação ao crescimento de células íntegras, apresentando o mesmo perfil de crescimento, que variou entre 22 ± 4 e 28 ± 3 g/L. Com relação a atividade enzimática da biomassa, novamente verifica-se que não houve relação direta entre a biomassa e a produção de lipase ligada ao micélio, sendo observada que dentre as concentrações e fontes de nitrogênio testadas, a peptona de soja na concentração de 70g/L, foi a que apresentou a maior atividade lipolítica dentre todas as variações testadas. Esses resultados são similares aos obtidos por Andrade et al. (2014) que investigaram diferentes fontes de nitrogênio no cultivo de células íntegras de *Mucor circinelloides*.

A fonte de nitrogênio apresenta um importante papel na síntese enzimática, sendo específica para cada tipo de micro-organismo. Fontes de nitrogênio orgânicas ou inorgânicas podem

ser utilizadas durante o cultivo celular. Yang et al. (2005) relataram que a peptona de soja favorece a síntese de lipase e a atividade enzimática de células imobilizadas de *R. arrhizus*, sendo este benefício atribuído a proteína macromolecular e aos óleos que constituem a peptona de soja.

De forma análoga aos cultivos celulares realizados em diferentes fontes de carbono, foram encontrados baixos valores de atividade enzimática no filtrado.

Definidas as fontes de carbono e nitrogênio, representadas por óleo de oliva (30 g/L) e peptona de soja (70 g/L), respectivamente, variou-se o pH do meio de cultura entre 5 e 8, com um incremento de 0,5, para os valores fixos de temperatura 30°C e quantidade de inóculo 1×10^6 esporos. O perfil de crescimento celular e de atividade enzimática tanto para o filtrado como para a biomassa é representado pela Figura 8.

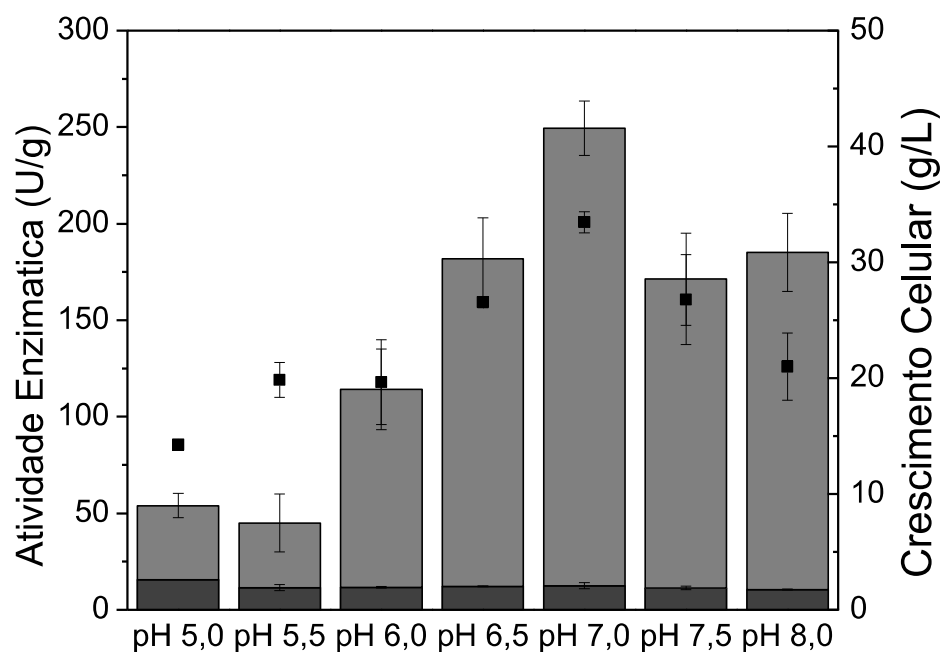


Figura 8 - Perfil de crescimento celular (■), atividade lipolítica do filtrado (■) e da biomassa (■) empregando diferentes pHs no cultivo das células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*. Condições de cultivo: FC óleo de oliva 30g/L, FN peptona de soja 70g/L, 30°C e 1×10^6 esporos.

Fonte: Do autor.

Pode-se observar na Figura 8 que o valor de atividade lipolítica para a biomassa seca obtida do cultivo em meio de cultura líquido em pH 7,0 foi o que apresentou melhor resultado, sendo este expresso em 249 ± 14 U/g, a um crescimento celular médio de $33,4 \pm 0,9$ g/L de meio de cultivo. Cultivos realizados em pH's diferentes influenciaram negativamente no cultivo celular de células íntegras de *P. citrinum*, assim como na atividade enzimática média das células íntegras. Observa-se que empregando as melhores condições nutricionais, a variação do pH do meio de cultivo próximo a neutralidade promoveu uma relação direta entre a biomassa formada e a respectiva produção de lipase ligada ao micélio. Isso pode estar relacionado ao fato de que pHs próximos a neutralidade estão de acordo com o meio de cultivo inicial que possui pH $7,0 \pm 0,3$, sendo este o pH ideal de crescimento e produção de lipase ligada ao micélio para as células íntegras de *P. citrinum*. Entretanto, diferentes resultados foram reportados para outros gêneros e espécies de fungos filamentosos. Essamri et al. (1998), em estudo da otimização da produção de lipase de *Rhizopus oryzae*, verificaram que a atividade enzimática para esta espécie de fungo é máxima em meio contendo pH 8,5, valor diferente encontrado por Wang et al. (2008), verificando um valor de pH ótimo de 6,0 para a produção de células íntegras de *Rhizopus chinensi*. Já segundo Yang et al. (2005), utilizando linhagens do fungo *Rhizopus arrhizus*, os valores de atividade lipolítica foram maximizados em meio contendo pH inicial de 7,18.

Mediante tais circunstâncias, pode-se concluir que os valores de atividade lipolítica encontrados utilizando meio de cultura líquido em pH 7,0 para a produção de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* foram os que apresentaram melhores resultados. Ressalta-se, ainda, que todos os ensaios promoveram a retenção da atividade enzimática das lipases ao micélio, fato verificado pelos baixos valores de atividade enzimática do filtrado posterior cultivo celular.

A fim de verificar a influência da temperatura na etapa de cultivo das células íntegras, foram realizados dois cultivos, um em temperatura fixa de 30°C e outro na temperatura de 40°C, ambos realizados nas seguintes condições ótimas definidas óleo de oliva (30 g/L), peptona de soja (70 g/L), pH 7,0 e quantidade de inóculo 1×10^6 esporos.

Ao final de 96h sob temperatura de 30°C, as células íntegras apresentaram crescimento celular de 22 ± 3 g/L de biomassa seca e atividade lipolítica média de biomassa de 218 ± 17 U/g e de filtrado de $10,6 \pm 0,7$ U/mL. No entanto, sob temperatura de 40°C não houve crescimento celular das células íntegras, indicando que o incremento em 10°C da temperatura de cultivo foi inibitório ao desenvolvimento das células. Resultados semelhantes foram obtidos por Essamri et al. (1998), que verificaram que o cultivo celular de células íntegras de *R. oryzae*

apresentam temperatura ótima de 30°C, e que valores superiores promoveram um decaimento da atividade enzimática, sendo nula na temperatura de 45°C.

O último parâmetro avaliado foi a quantidade de inóculo expresso em concentração de esporos. Fixadas as condições de cultivo em óleo de oliva (30 g/L), peptona de soja (70 g/L), pH 7,0 e temperatura de 30°C, os valores referentes ao crescimento celular e à atividade lipolítica, tanto para o filtrado como para a biomassa, são mostrados na Figura 9.

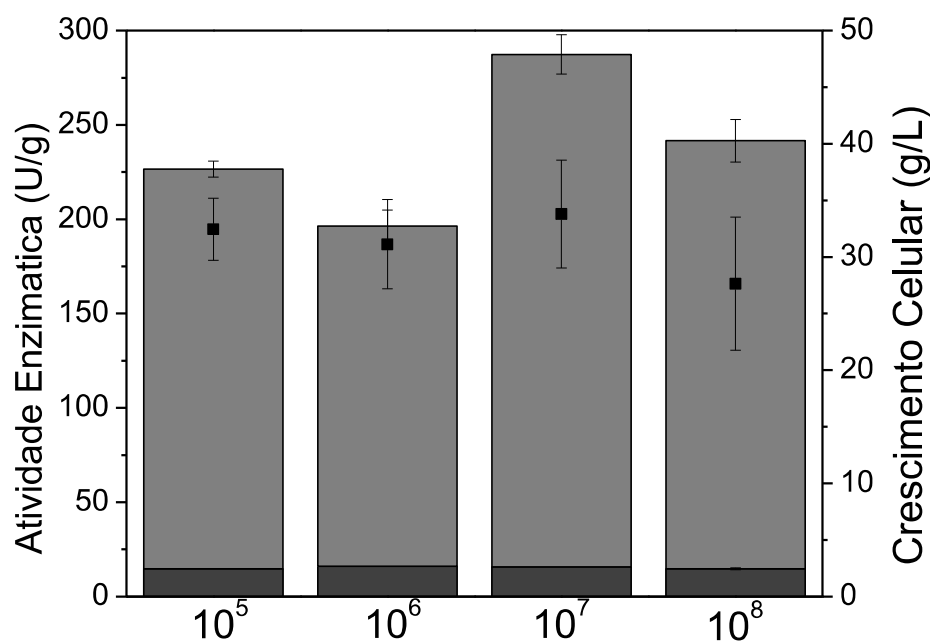


Figura 9 - Perfil de crescimento celular (■), atividade lipolítica do filtrado (■) e da biomassa (■) empregando diferentes quantidades de inóculo no cultivo das células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*. Condições de cultivo: FC óleo de oliva 30g/L, FN peptona de soja 70g/L, 30°C e pH 7,0.

Fonte: Do autor.

A Figura 9 mostra que o maior valor de crescimento celular (34 ± 5 g/L) e atividade lipolítica (287 ± 20 U/g) foi obtido ao utilizar concentração de 1×10^7 esporos do fungo filamentoso *P. citrinum* e que não houve variação significativa na produção de biomassa com o aumento da concentração de esporos.

Andrade et al. (2014) relatam que a concentração de inóculo pode ser um fator crítico

para o processo de produção de células íntegras livres ou imobilizadas, além de afetar diretamente na atividade da lipase. Segundo os autores, não houve diferenças significativas no crescimento celular de células íntegras de *Mucor circinelloides*, entretanto, valores máximos de atividade lipolítica foram obtidos quando utilizados valores baixos de níveis de inóculo (1×10^6 esporos).

Teng et al. (2008) mostram a influência do inóculo na morfologia fúngica. Em estudo da relação da morfologia de células íntegras de *R. chinensis* e produção de lipases empregando diferentes níveis de inóculo, foi obtido um aumento da produção de lipase quando o micélio cresceu como filamentos emaranhados, fato observado quando foram utilizados níveis mais baixos de inóculo. Ainda segundo os autores, níveis superiores a 1×10^7 esporos tendem a formar micélios dispersos levando a redução da produção de lipase.

De maneira geral, pode-se perceber que em todos os ensaios realizados nesta etapa, independente da condição adotada como sendo ótima, houve retenção da lipase ao micélio, apresentando de forma minimizada a liberação de enzimas extracelulares durante o cultivo celular. Isso confirmou-se pelos valores de atividade enzimática médio do filtrado que foram de apenas $15,2 \pm 1,4$ U/g comparado ao valor médio de 240 ± 18 U/g apresentado pela biomassa seca após etapa de determinação das melhores condições do crescimento celular. Isso indica que todos os parâmetros adotados, além de aumentar, também favorecem a produção de lipase ligada ao micélio.

Deste modo, foram estabelecidas, ao final desta etapa, as melhores condições de cultivo de células íntegras livres e imobilizadas com atividade ligada ao micélio, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Determinação das melhores condições de cultivo de células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*.

Parâmetros	Melhor condição
Fonte de Carbono (30 g/L)	Óleo de oliva
Fonte de Nitrogênio (70 g/L)	Peptona de soja
pH	7,0
Temperatura (°C)	30
Quantidade de inóculo/100mL de meio de cultura	1×10^7

Fonte: Do autor.

5.2. Caracterização dos efluentes

Composto pelo soro de leite residual proveniente do beneficiamento de leite para a produção de produtos lácteos e queijos, água de lavagem de dutos e tanques de leite, bem como de pisos e demais setores da fábrica, esgoto sanitário e reagentes utilizados nos laboratórios de qualidade, o efluente da indústria de produtos lácteos Bandeira[®] pode ser caracterizado quanto a densidade, umidade, série de sólidos, pH, concentração de lipídeos e demanda química de oxigênio (DQO). De forma análoga a caracterização realizada para o efluente industrial, foi caracterizada uma solução contendo o soro sintético em uma concentração teórica de DQO 50.000 mg/L. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização do efluente da indústria de produtos lácteos Bandeira[®] e de uma solução contendo soro de leite sintético em uma concentração de DQO 50.000 mg/L.

Parâmetros	Efluente indústria Bandeira [®]	Soro de leite sintético
Densidade (g/mL)	1,046 ± 0,003	1,009 ± 0,006
Umidade (%)	91,6 ± 0,2	93,7 ± 0,4
Sólidos Totais (g/L)	90,4 ± 0,3	63,0 ± 0,3
Sólidos Voláteis (g/L)	86,07 ± 0,08	60,9 ± 0,3
Sólidos Fixos (g/L)	4,4 ± 0,4	2,1 ± 0,3
pH	3,97 ± 0,08	5,87 ± 0,06
Lipídeos (mg/L)	3.100 ± 54	1.480 ± 13
DQO (mg/L)	44.162 ± 1.348	49.854 ± 1.587

Fonte: Do autor.

A partir dos valores obtidos na Tabela 8, verifica-se que o valor de umidade encontrado para o efluente industrial e para o soro de leite sintético analisado é próximo ao valor verificado no efluente utilizado por Parzianello (2011) que avaliou a biodigestão anaeróbia da mistura de resíduos avícolas e lácteos, cuja umidade do resíduo ficou em torno de 94,9 %.

O valor de DQO de 44.162,8 ± 1.348 mg/L do efluente industrial bruto, aliado ao alto valor de lipídeos (3.100 ± 54) encontrados, mostra a necessidade da realização do pré-tratamento enzimático do efluente. O descarte de efluentes que apresentam elevados valores de DQO representam impacto ambiental negativo, promovendo danos potenciais a biota. Sistemas de tratamento de águas residuárias que apresentam elevados teores de remoção de DQO

apresentam uma alternativa no controle dos impactos ambientais gerados pelo descarte incorreto dos efluentes industriais.

Concentrações de lipídeos superiores a 600 mg/L foram encontrados nos efluentes utilizados por Cammarota, Teixeira e Freire (2001), Valente et al. (2010) e Leal et al. (2006), sendo considerados efluentes que apresentam elevadas concentrações de lipídeos, precursores dos problemas enfrentados no emprego de sistemas de tratamentos biológicos convencionais. Mendes (2004) cita concentrações médias de lipídeos de 4.680 mg/L nos efluentes gerados pelas indústrias de laticínios.

Concentrações de lipídeos elevadas, como as encontradas nos efluentes industriais de produtos lácteos, apresentam condições ideais para o emprego de enzimas lipolíticas, uma vez que estes efluentes apresentam fontes de substrato em qualidade e abundância devido aos elementos que os constituem.

Um dos principais parâmetros do resíduo para tratamento de efluentes e produção do biogás é o teor de sólidos voláteis, quanto maior a sua concentração, maior é a quantidade de matéria orgânica a ser degradada pelas bactérias anaeróbias no processo de biodigestão (VON SPERLING, 2005). A partir da Tabela 8, constata-se que o valor de sólidos voláteis obtidos foi alto, em torno de 90% dos sólidos totais, apresentando um alto potencial de degradação e produção de biogás.

5.3 Pré-tratamento enzimático do soro de leite e efluente industrial empregando células livres

5.3.1 Avaliação da influência de DQO na hidrólise enzimática do soro de leite sintético

Para a realização dos testes iniciais de hidrólise enzimática, foi utilizado soro de leite sintético em cinco diferentes concentrações teóricas de DQO em mg/L, com o objetivo de avaliar a influência da concentração de DQO na atuação das células íntegras na hidrólise desse substrato. Em todos os ensaios foram empregados 10 % de células íntegras livres em relação ao substrato equivalendo a um carregamento de atividade fornecida de 8.300 U.

Cinco soluções de diferentes concentrações de DQO foram preparadas e submetidas a reação de hidrólise por 6 horas. A Tabela 9 mostra os valores em concentração de gordura para cada solução preparada e a Figura 10 mostra os resultados obtidos para cada ensaio de hidrólise do soro de leite sintético.

A realização da análise, em duplicata, da concentração de óleos e gorduras foi realizada para uma amostra de soro de leite sintético, a uma DQO teórica de 50.000 mg/L, presente em um volume de 200 mL. Deste modo, foram encontrados os valores da concentração de óleos e gorduras para as demais concentrações de DQO, dividindo o valor encontrado referente a DQO teórica de 50.000 mg/L pelas demais concentrações de DQO.

Tabela 9 - Concentração de lipídeos para diferentes concentrações de DQO (mg/L) do soro de leite sintético.

Amostras	DQO teórica (mg/L)	Óleos e gorduras (mg/L)
1	1.000	30
2	5.000	150
3	10.000	300
4	30.000	900
5	50.000	1500

Fonte: Do autor.

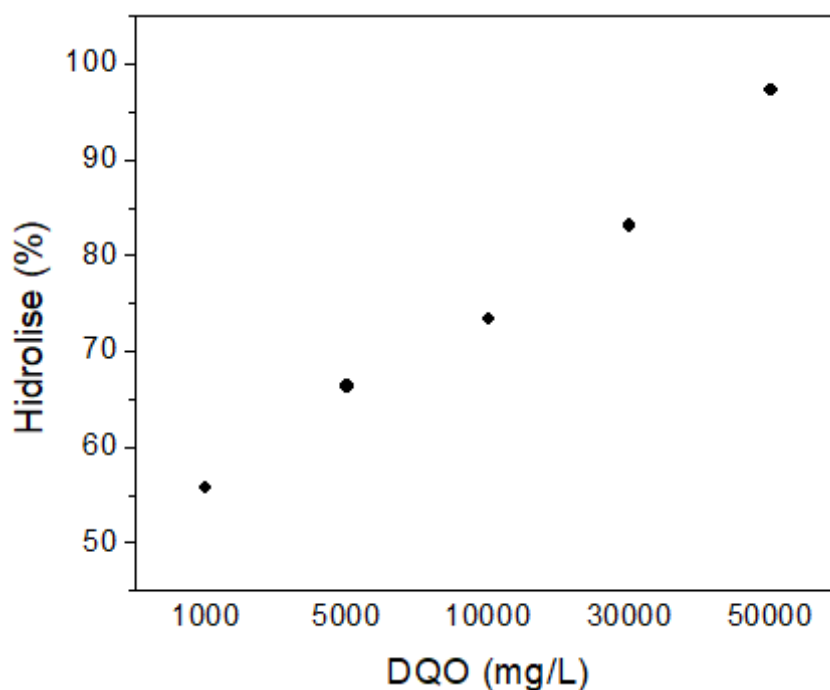


Figura 10 - Influência da concentração de DQO (mg/L) na hidrólise do soro de leite sintético empregando células íntegras livres de *P. citrinum*. Condições de cultivo: pH inicial 8, 37°C, 8.300 U, 6 h. Erro analítico: 3%.

Fonte: Do autor.

Nota-se na Figura 10 que a concentração teórica de DQO de 50.000 mg/L apresentou a

melhor porcentagem de hidrólise (97 ± 3 %) em comparação as demais, sendo este o valor de concentração de DQO próximo ao valor médio encontrado para os efluentes de indústrias de produtos lácteos e do soro de leite proveniente da fabricação de queijos.

Em estudo realizado por Mendes (2004), efluentes da indústria de derivados lácteos apresentam pH médio de 7,2, podendo variar entre 4,5 e 9,4. Já o efeito do pH sobre o tratamento anaeróbio de águas residuárias é ótimo entre 6,4 e 7,2 (NOGUEIRA, 1986).

A Figura 11 apresenta o comportamento do pH sob diferentes concentrações de DQO, em mg/L, durante a etapa de hidrólise do soro de leite sintético, ao final de 6 horas de reação.

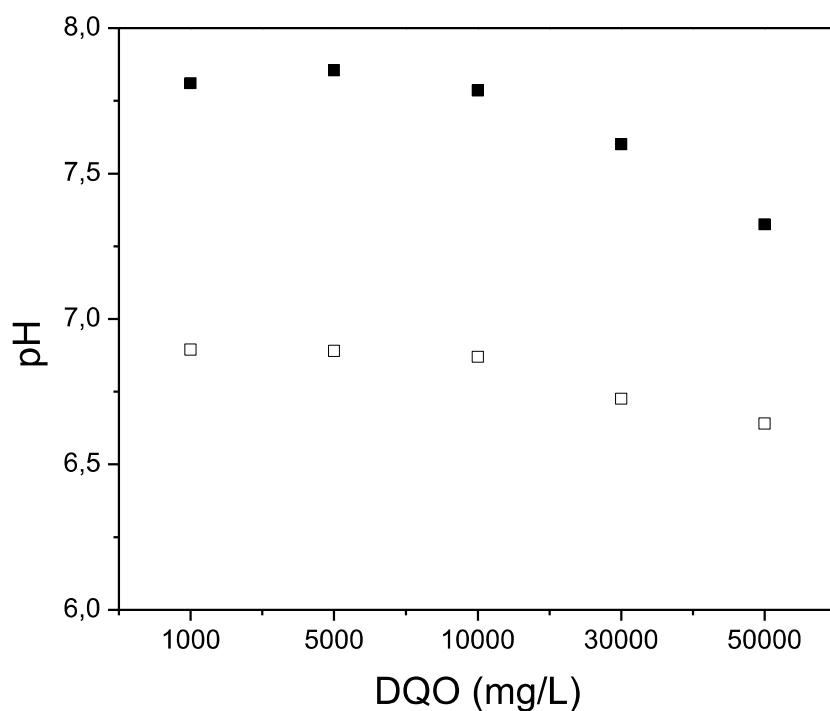


Figura 11 - Perfil do pH obtido ao final da hidrólise do soro de leite sintético (■) sem pré-tratamento (controle) e (□) com pré-tratamento empregando células íntegras livres de *P. citrinum*. Condições de cultivo: pH inicial 8, 37°C, 8.300 U, 6 h. Erro analítico: 1%.

Fonte: Do autor.

Pode-se verificar que o pH do meio tende a ficar mais ácido devido a conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e glicerol, os quais serão posteriormente degradados em estruturas mais simples como o dióxido de carbono e metano, ao final da etapa de biodigestão anaeróbia. Observa-se também que o pH apresentado pelo soro

de leite hidrolisado encontra-se na faixa de pH ótima para o posterior processo de biodigestão anaeróbia.

Valores de pH do efluente acima de 8,5 reduzem de forma significativa a eficiência de caixas de gordura para a remoção de lipídeos em estado livre. Durante o tratamento primário de águas residuárias, o pH elevado, acima de 8,5, também pode causar a saponificação ou a emulsificação do meio, além do excesso de detergentes presentes no meio podem prejudicar a separação das partículas de gordura, havendo a formação de partículas de gordura de menor tamanho, conseqüentemente, com menor velocidade ascensional. Adições de produtos químicos são responsáveis pela quebra da formação de emulsão, seguida de flotação com ar dissolvido, porém estes apresentam custos operacionais elevados, além da geração de lodo químico (MARSHALL; HARPER, 1984).

Segundo Portes (2005), durante o processo de biodigestão anaeróbia, o pH do meio reacional deve ser monitorado a fim de que não haja a interrupção do processo em meio ácido ou favoreça a inibição do processo em meio alcalino.

A Figura 12 representa o perfil de formação de ácidos graxos livres, ao final de 6 horas de reação, durante a etapa de hidrólise do soro de leite sintético sob diferentes concentrações de DQO, em mg/L.

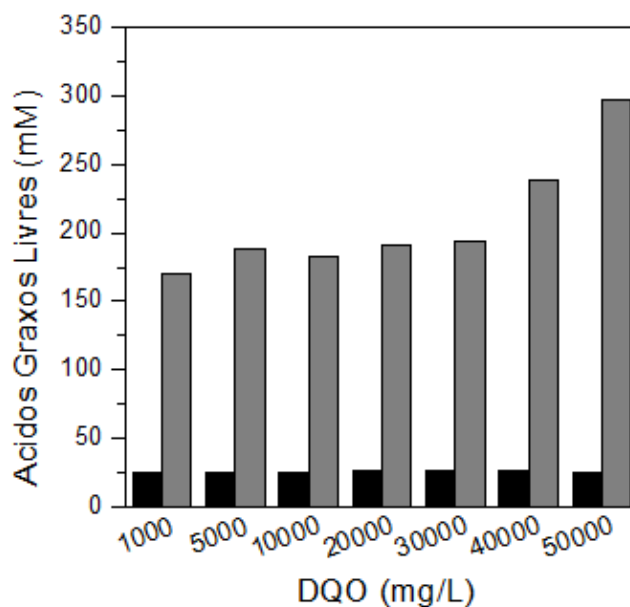


Figura 12 - Perfil da formação de ácidos graxos livres, em mmol/L, ao final da hidrólise do soro de leite sintético (■ sem pré-tratamento/controle; ■ com pré-tratamento) empregando células íntegras livres de *P. citrinum*. Condições de cultivo: pH inicial 8, 37°C, 8.300 U, 6 h. Erro analítico: 3%.

Fonte: Do autor.

A concentração teórica de DQO de 50.000 mg/L foi a que apresentou o melhor índice de formação de ácidos graxos livres (298 ± 9 mmol/L), cerca de 12 vezes acima do valor apresentado pelo efluente sem o pré-tratamento enzimático.

Segundo Cammarota, Texeira e Freire (2001), em estudo do emprego de enzimas lipolíticas de *Penicillium restrictum*, obtidas por técnica de fermentação em estado sólido, na hidrólise de efluentes de produtos lácteos de elevado teor lipídico, foram observados um decaimento da concentração de ácidos graxos livres após 24 horas de reação, fato este atribuído pelos autores ao consumo de ácidos graxos livres como substratos por micro-organismos aeróbicos presentes no meio reacional.

Leal et al. (2006) relatam que a produção de ácidos graxos aumentou quase linearmente nas primeiras 12 horas de hidrólise dos efluentes da indústria de laticínios em três diferentes concentrações de lipídeos (200, 600 e 1.000 mg/L) analisadas. Após as primeiras 12 horas de reação, os testes conduzidos a temperatura de 45°C produziram ácidos graxos livres de forma mais rápida, fato não observado nos experimentos conduzidos a temperaturas de 25 e 35°C, utilizando lipases de *Penicillium restrictum*,

Ao final desta etapa, pode-se verificar que o comportamento do pH e formação de ácidos graxos livres apresentados pelo meio reacional, inicialmente em pH 8,0 e DQO 50.000 mg/L (teórica), após pré-tratamento enzimático, podem trazer benefícios quanto ao posterior processo de biodigestão anaeróbia, levando a um incremento do potencial de biodegradabilidade do efluente e produção de biogás.

Mediante realização de testes iniciais, verifica-se a potencialidade da utilização de lipase ligada ao micélio no pré-tratamento enzimático de efluentes com alto teor de carga lipídica, uma vez que a digestão anaeróbia é um processo lento limitado pela liberação de ácidos graxos pelos micro-organismos específicos com atividade lipolítica.

5.3.2 *Influência do carregamento de atividade fornecida pelas células íntegras livres na hidrólise enzimática do soro de leite sintético e do efluente*

Com o objetivo de avaliar a influência do carregamento de atividade fornecida e as condições de homogeneização do meio reacional, foram testados três diferentes valores de carregamento enzimático, em duplicata, no processo de hidrólise do soro de leite sintético, em meio reacional preparado com DQO 50.000 mg/L (teórica), devido ao melhor desempenho obtido nos testes preliminares. A Figura 13 descreve o perfil cinético obtido ao longo de 48

horas de reação de hidrólise.

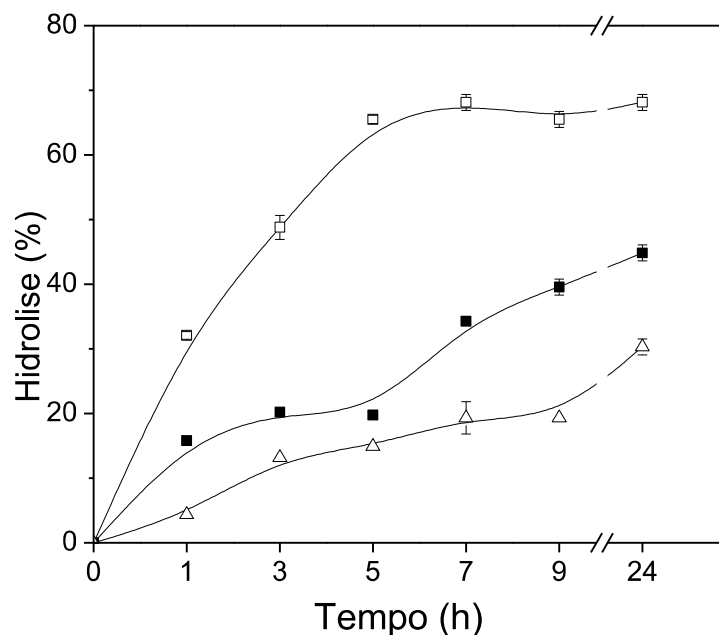


Figura 13 - Perfil cinético da hidrólise do soro de leite sintético empregando diferentes carregamentos enzimáticos (Δ 1.300 U; \blacksquare 2.300 U e \square 4.500 U) das células íntegras livres de *P. citrinum*. Condições de cultivo: pH 8, 37°C, DQO 50.000 mg/L, 24 h.

Fonte: Do autor.

Na Figura 13, pode-se observar que o grau de conversão de triacilglicerol em ácido graxo de cadeia longa (AGCL) e glicerol, utilizando células íntegras livres como biocatalisador, é proporcional a atividade enzimática fornecida ao meio. Entretanto, os experimentos indicaram, por meio de observação experimental, que os ensaios realizados com carregamento de 1.300 U apresentaram melhores condições de homogeneização em comparação aos demais carregamentos, visto que, valores maiores de atividade fornecida requerem maiores quantidades de biocatalisador para o mesmo volume de meio reacional, o que dificulta a homogeneização e promove a formação de resíduo sólido pela compactação das células suspensas. Além disso verificou-se em trabalhos que empregam sólidos fermentados com enzimas lipolíticas na hidrólise de efluentes industriais, como os apresentados por Valente et al. (2010), Leal et al. (2006) e Cammarota, Teixeira e Freire (2001), a utilização do biocatalisador em concentrações inferiores a 2% m/v.

Dessa forma, para os testes subsequentes com efluente foi adotado o carregamento de

1.300 U de atividade enzimática fornecida.

A fim de verificar a potencialidade do emprego de células íntegras livres na hidrólise do efluente da indústria de produtos lácteos, a reação de hidrólise foi conduzida em *shaker* utilizando carregamento de 1.300 U, que representa cerca de 1,66% de células íntegras livres em relação ao substrato.

A Figura 14 apresenta o perfil cinético obtido ao final de 48 horas de reação de hidrólise.

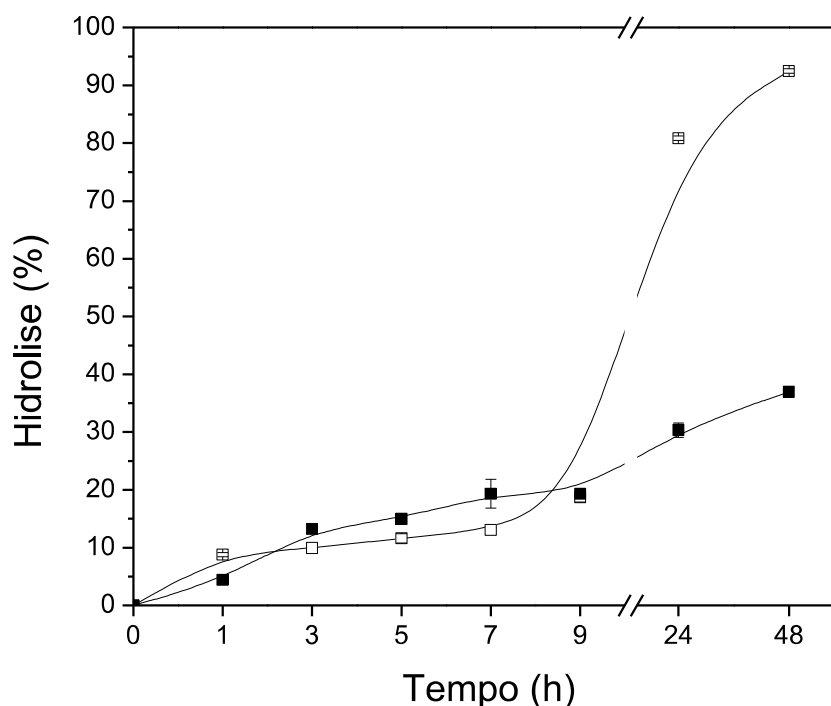


Figura 14 - Perfil cinético da hidrólise do efluente bruto industrial (□) e do soro de leite sintético (■), DQO 50.000 mg/L, empregando células íntegras livres de *P. citrinum*. Condições de cultivo: pH 8, 37°C, 1.300 U, 48 h.

Fonte: Do autor.

Verifica-se que altos valores de conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol foram obtidos ao final de 24 e 48 horas de reação no emprego de efluente bruto como fonte de substrato, $80,8 \pm 0,4$ e $92,5 \pm 0,4$ %, respectivamente, superando os valores encontrados nos ensaios que empregaram o soro de leite sintético, que foram de 30 ± 1 e $36,1 \pm 0,6$ %. Visto que um maior fornecimento de substrato as enzimas lipolíticas conferem um aumento da velocidade de reação, pode-se atribuir este resultado a maior carga lipídica encontrada no efluente (3100 ± 54 mg/L) em relação ao soro de leite sintético (1500 ± 16 mg/L) com

concentração de DQO de 50.000 mg/L (teórica). Além disso, a composição do efluente bruto pode ter influenciado positivamente na atuação da lipase ligada ao micélio.

Em águas residuárias, os lipídeos se encontram, preferencialmente, na forma de triacilgliceróis, apresentando uma pequena parte na forma de ácidos graxos livres de cadeia longa (AGCL), com destaque para os ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico (QUÉMÉNUER; MARTY, 1994).

Masse et al. (2001) relatam que o emprego de substâncias como os íons, peptídeos e alguns aminoácidos podem potencializar a atividade hidrolítica das lipases. Em relação ao processo de hidrólise, triglicerídeos apresentados por alguns ácidos graxos como o ácido oleico, presente em grande parte nos efluentes de elevada carga lipídica, principalmente no que diz respeito ao efluente da indústria de produtos lácteos, sofrem hidrólise com maior rapidez do que quando comparados aos diglicerídeos e os triglicerídeos de cadeia curta, como por exemplo, o ácido butírico. Ainda segundo os autores, as gorduras são atacadas mais ativamente que outros ésteres de ácidos graxos.

Dharmstithi e Kuhasuntisuk (1998) investigaram o efeito da adição de soluções comerciais de lipases como sistema biológico de tratamento do efluente gerado por restaurantes, reportando a remoção total da carga lipídica após 48 horas da incubação do efluente com as enzimas lipolíticas.

Em estudo realizado acerca da composição média de ácidos graxos do soro de queijo e efluentes provenientes das indústrias de produtos lácteos por Mendes (2004), os principais ácidos graxos que compõem os efluentes são o palmítico, apresentando uma concentração superior a 30%, seguido do oleico, superior a 20%, esteárico e o mirístico, ambos apresentando concentrações superiores a 10%. Em relação a gordura presente no leite, estes ácidos graxos estão presentes na mesma proporção, porém em menores concentrações, sendo este fato atribuído à maior concentração de ácidos de baixa massa molar, como os apresentados pelos ácidos butírico, capríco e o cáprico.

5.3.3 *Influência do pH do substrato na hidrólise enzimática do efluente*

Em virtude do incremento nas taxas de hidrólise enzimática promovida pelas células íntegras de *P. citrinum* sobre o efluente bruto, avaliou-se a influência do pH na atuação do biocatalisador neste substrato.

A Figura 15 apresenta o perfil cinético obtido durante os ensaios de hidrólise enzimática

utilizando células íntegras livres em meios com diferentes pH's.

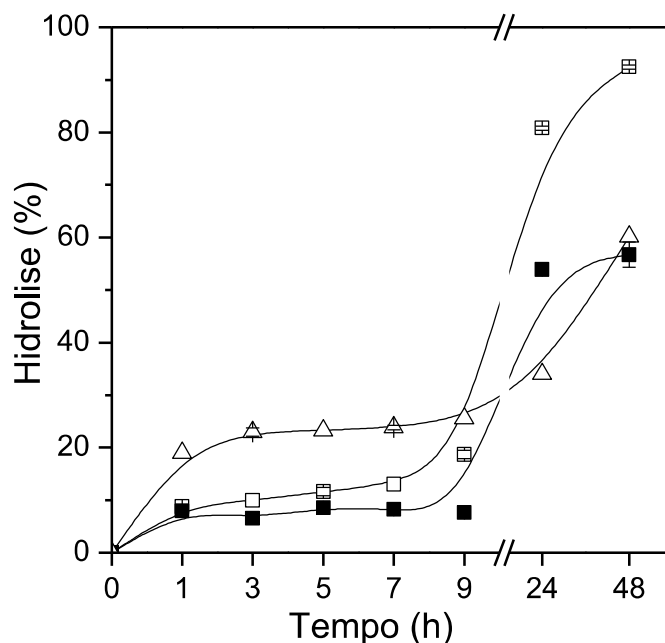


Figura 15 - Perfil cinético da hidrólise do efluente bruto industrial, DQO 50.000 mg/L, sob diferentes pHs (Δ 4,0 *in natura*; ■ 7,0 e □ 8,0) empregando células íntegras livres de *P. citrinum*. Condições de cultivo: 37°C, 1.300 U, 48 h.

Fonte: Do autor.

De acordo com a Figura 15, o desempenho das células íntegras em meio reacional pH 8,0 sobressaiu sobre os demais valores de pH ao final de 48h, apresentando cerca de $91,5 \pm 0,6$ % de hidrólise do efluente industrial. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Lima (2017) que investigou o pH ótimo de atuação da lipase ligada ao micélio das células íntegras de *P. citrinum* e obteve os melhores resultados em pH 8,0 nas reações de hidrólise dos óleos de oliva e soja.

5.4 Pré-tratamento enzimático do soro de leite e efluente empregando células íntegras imobilizadas

Tendo em vista os bons resultados alcançados na utilização de células íntegras livres na hidrólise do soro de leite sintético e efluente bruto, e sabendo-se que as células íntegras imobilizadas permitem a sua reutilização gerando uma diminuição considerável nos custos finais do

processo, julgou-se necessário avaliar o desempenho das células íntegras imobilizadas em espumas de poliuretano no pré-tratamento enzimático de ambos os substratos lipídicos.

As células íntegras imobilizadas foram cultivadas no mesmo tempo de incubação das células livres (96 h) e tiveram um crescimento celular médio de 16 ± 2 g/L de biomassa seca e atividade lipolítica média na biomassa de 210 ± 14 U/g e no filtrado $6,4 \pm 0,3$ U/mL. Uma comparação entre a morfologia das células íntegras livres e células íntegras imobilizadas em espumas cúbicas de poliuretano, ao final de 96h de incubação pode ser visualizada na Figura 16 (a,b).

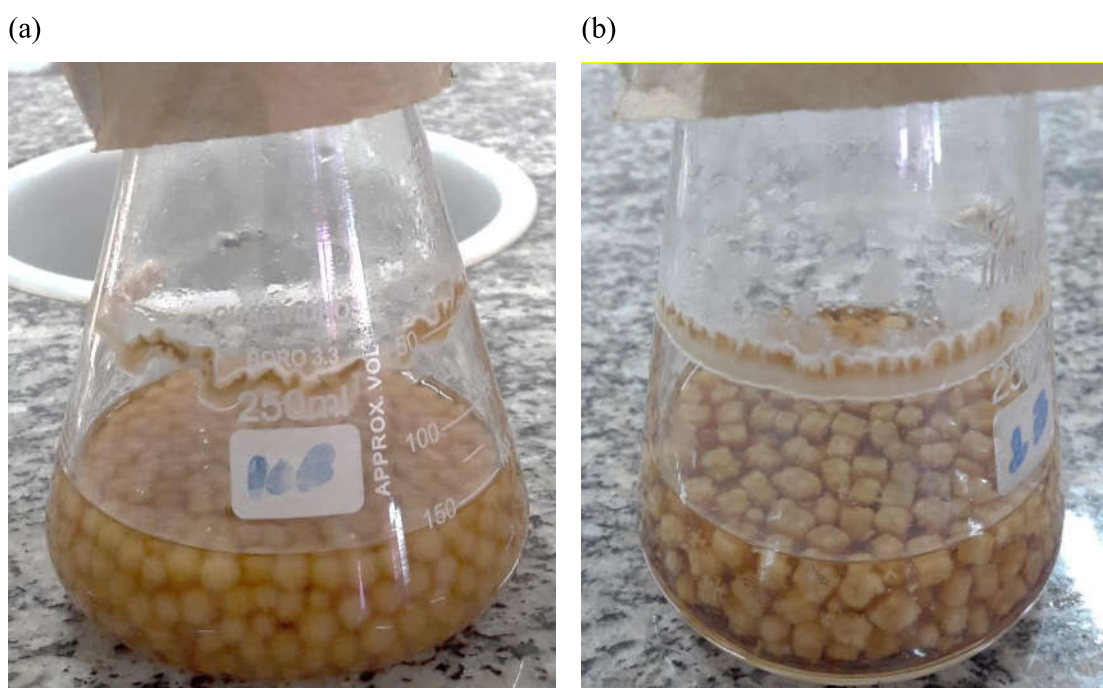


Figura 16 - Morfologia das células íntegras livres (a) e das células íntegras imobilizadas em espumas cúbicas de poliuretano (b). Condições de cultivo: pH 8, 30°C, 96h.

Fonte: Do autor.

Verifica-se na Figura 16b que a presença do suporte espumas cúbicas de poliuretano não afetou a produção de biomassa fúngica que ficaram fortemente aderidas ao suporte. Por outro lado, na ausência de suporte, as células íntegras livres (Figura 16a) apresentam morfologia de crescimento em pellets. Em ambos os casos, a atividade enzimática da lipase ligada ao micélio manteve-se constante e não foi afetada pela imobilização celular.

5.4.1 Influência da atividade fornecida na hidrólise enzimática do soro de leite sintético

Nesta etapa, assim como no emprego de células íntegras livres, foram estudadas a influência de diferentes carregamentos de atividade enzimática fornecida de células íntegras imobilizadas. Foram considerados os carregamentos enzimáticos de 700 U e 1.300 U, representando a utilização de 0,75 e 1,5% m/v de biocatalisador, respectivamente. A utilização de valores mais baixos de atividade fornecida em comparação as células íntegras livres se deve ao fato de que a presença do suporte polimérico poroso promove um aumento no volume do meio reacional, sendo inviável a utilização de carregamentos maiores.

A Figura 17 representa o perfil cinético da hidrólise do soro de leite sintético em pH 8,0, para uma concentração de DQO de 50.000 mg/L (teórica), em dois valores diferentes de carregamento enzimático.

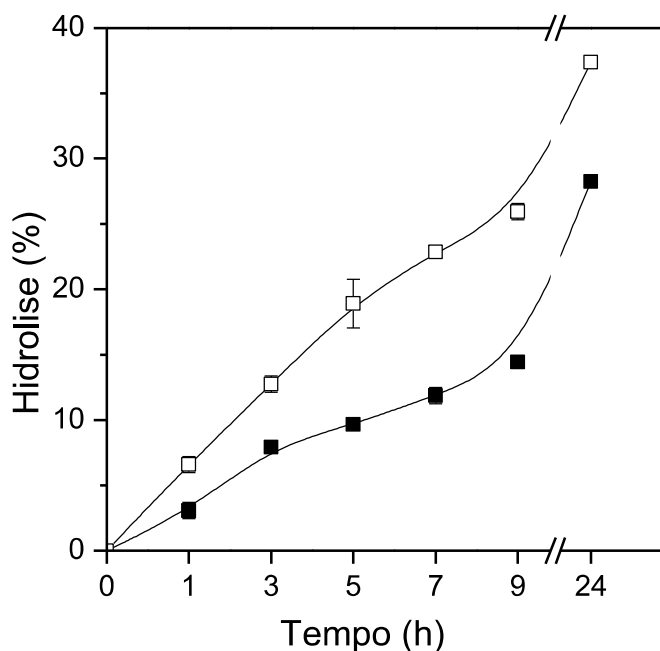


Figura 17 - Perfil cinético da hidrólise do soro de leite sintético empregando diferentes carregamentos enzimáticos (■ 700 U e □ 1.300 U) das células íntegras imobilizadas de *P. citrinum*. Condições de cultivo: pH 8, 37°C, DQO 50.000 mg/L, 24 h.

Fonte: Do autor.

De acordo com a Figura 17, o meio contendo o dobro de atividade enzimática fornecida (1.300 U) foi o que apresentou melhor desempenho, fato verificado pelo aumento da velocidade

de reação devido a maior concentração de enzimas lipolíticas disponíveis. No entanto, ao final de 24 horas de hidrólise, pode-se observar que a taxa de conversão de $37,3 \pm 0,2$ % foram inferiores as conversões apresentadas pelas células íntegras livres.

Segundo Canilha, Carvalho e Silva (2006), o processo de imobilização enzimática confere maior estabilidade as enzimas, uma vez que a matriz utilizada na imobilização enzimática protege as enzimas contra agentes externos devido a sua alta resistência mecânica. Entretanto, desvantagens como a redução da atividade enzimática e as limitações de transferência de massa e oxigênio, afetando a fisiologia e cinética do crescimento celular devem ser considerados.

Considerando a seleção da fonte de substrato como fator primordial para a maximização da conversão de triacilgliceróis em ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) e glicerol pelas enzimas lipolíticas, foi testada o desempenho das células imobilizadas na hidrólise do efluente, visto que este apresenta o dobro da concentração de lipídeos. O ensaio de hidrólise enzimática foi realizado em *Shaker* a uma atividade enzimática fornecida de 1.300 U, representando 1,24 % m/v de biocatalisador.

A Figura 18 representa o perfil cinético da hidrólise do efluente em pH 8, utilizando células íntegras imobilizadas como biocatalisador da reação, com atividade fornecida de 1.300 U.

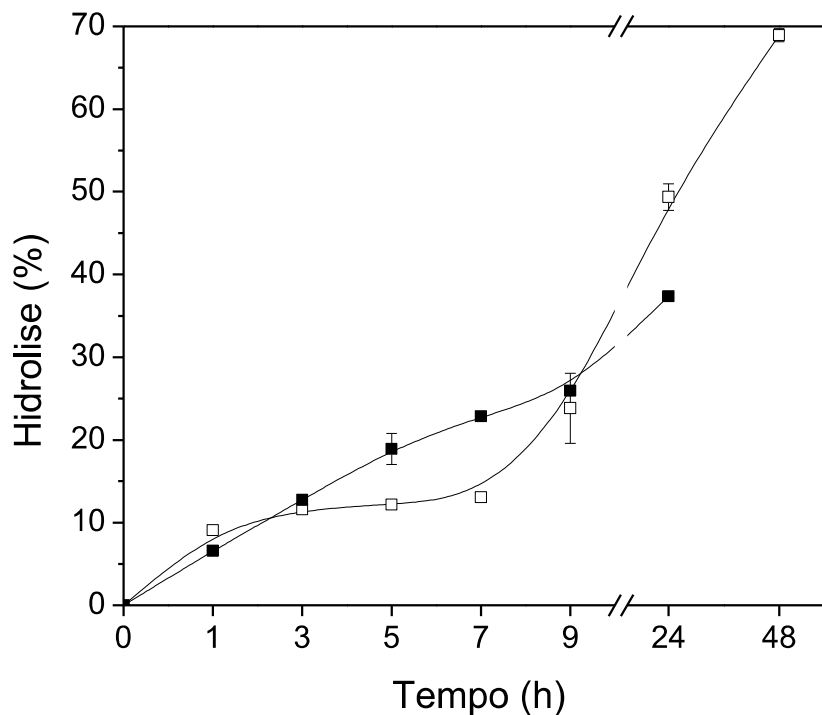


Figura 18 - Perfil cinético da hidrólise do efluente bruto industrial (□) e do soro de leite sintético (■), DQO 50.000 mg/L, empregando células íntegras imobilizadas de *P. citrinum*. Condições de cultivo: pH 8, 37°C, 1.300 U, 48 h.

Fonte: Do autor.

Assim como apresentado pelas células íntegras livres, altas porcentagens de hidrólise foram alcançadas ao final de 48 horas de reação para as células imobilizadas, utilizando efluente bruto industrial como fonte de substrato, da ordem de $68,9 \pm 0,8$ %. No entanto, o ensaio realizado utilizando células íntegras livres se sobressaiu frente a utilização de células íntegras imobilizadas, representando um incremento de 34,16 % no grau de hidrólise em relação ao valor de hidrólise apresentado pelas células íntegras imobilizadas.

Considerando a aplicação das células íntegras em escala industrial para o pré-tratamento de efluentes de elevado teor de lipídeos, o processo de imobilização traz vantagens como a reutilização dos biocatalizadores em processos contínuos e descontínuos, fato que deve ser levado em conta devido ao custo de produção das enzimas lipolíticas (WANG et al., 2005).

5.4.2 Influência do pH do substrato na hidrólise enzimática do efluente

Como última etapa, foram realizados ensaios de hidrólise comparando o desempenho das células íntegras imobilizadas em diferentes pH's, utilizando como fonte de substrato o efluente industrial da fabricação de produtos lácteos. A Figura 19 sintetiza o comportamento adotado pelas células íntegras imobilizadas a uma atividade enzimática total fornecida de 1.300 U durante os ensaios de hidrólise dos meios contendo pH 4; 7 e 8.

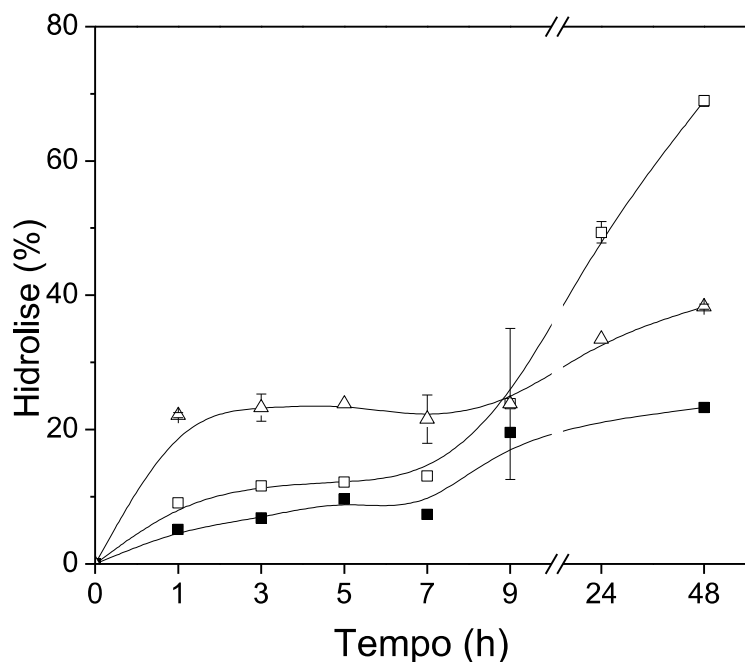


Figura 19 - Perfil cinético da hidrólise do efluente bruto, DQO 50.000 mg/L, sob diferentes pHs (Δ 4,0 *in natura*; ■ 7,0 e □ 8,0) empregando células íntegras imobilizadas de *P. citrinum*. Condições de cultivo: 37°C, 1.300 U, 48 h.

Fonte: Do autor.

Os valores em porcentagem de hidrólise enzimática apresentados pelas enzimas presentes nas células íntegras livres foram superiores em todos os ensaios quando comparados a utilização de células imobilizadas em mesmo meio reacional sob mesmo valor de pH. Ademais, reações conduzidas em meio ajustado em pH 8, utilizando tanto células íntegras livres como imobilizadas, se sobressaíram sobre as reações conduzidas em pH 7 e 4 (*in natura*). Esses resultados corroboram com os obtidos por Lima et al. (2017) que determinou o pH 8,0 como pH ótimo de atuação das células íntegras de *P. citrinum* imobilizadas em espumas de poliuretano

na hidrólise dos óleos de oliva e soja.

Segundo Borzani et al. (2001), o processo de imobilização enzimática pode deslocar o valor de pH e temperatura ótimos de atuação das enzimas. Em análise prévia da Figura 19, verifica-se que o pH ótimo de atuação das lipases tanto na sua forma livre como imobilizada em suporte sólido são os mesmos, não sofrendo alteração significativa posterior processo de imobilização enzimática.

5.5 Avaliação do potencial de biodegradabilidade anaeróbia e produção de gás metano

Tendo em vista que as células íntegras livres apresentaram resultados superiores aos apresentados pelas células íntegras imobilizadas, os ensaios de atividade metanogênica específica (AME) foram realizados somente para as células íntegras livres. Os ensaios de AME, para as três condições de biodigestão anaeróbia analisadas, foram conduzidos por um período máximo de 74 horas ou até a observação de estabilidade na produção de metano, quantificado pelo não deslocamento da coluna de solução de NaOH presente na proveta do sistema de medição do teste da AME.

A Figura 20 apresenta os dados experimentais obtidos para cada condição testada e o ajuste matemático ao modelo de Gompertz modificado.

Pode-se verificar, que o ajuste fornecido pelo modelo de Gompertz modificado apresenta uma forte correlação com os dados experimentais obtidos para cada condição (Figura 20), sendo comprovados pelos valores de R^2 obtidos para os dados experimentais com distribuição normal. Ainda de acordo com o modelo, foi possível obter os parâmetros de fase lag (λ), em horas, taxa máxima de produção de metano (R_m), em mL/h, e produção máxima de metano (P), em mL, para cada condição analisada, sendo estes apresentados na Tabela 10.

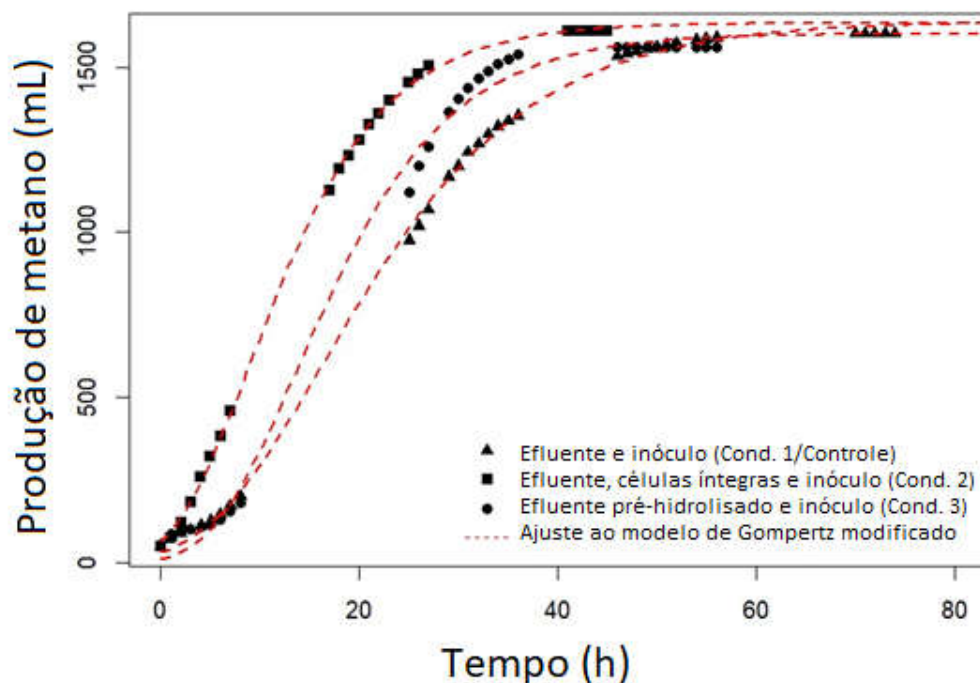


Figura 20 - Perfil experimental e ajuste ao modelo de Gompertz modificado para as três condições verificadas no teste de atividade metanogênica específica (AME). Condições de ensaio: 350 mL de efluente em pH 7, 106 mL de inóculo granular da Avícola Dacar[®] e 1.300 U presentes nos ensaios que requerem a utilização de enzimas lipolíticas livres.

Fonte: Do autor.

Tabela 10 - Parâmetros da fase lag, taxa máxima de produção de metano e produção máxima de metano, obtidos do ajuste ao modelo matemático de Gompertz modificado para cada condição analisada.

Condição	Fase lag (λ)	Taxa Máxima (Rm)	Produção Máxima (P)	R ²
1	4,5±0,3	50,9±0,7	1639±7	0,9990
2	1,3±0,1	78,2±0,8	1633±7	0,9959
3	5,2±0,5	68±2	1602±16	0,9996

Fonte: Do autor.

O meio contendo o efluente pré-hidrolisado com células íntegras livres do fungo filamentososo *P. citrinum* (condição 3), a um carregamento enzimático de 1.300 U, equivalente a

2,5% m/v de biocatalisador na reação de hidrólise e inóculo granular Dacar[®], foi o que apresentou maior tempo (h) de fase lag (λ) ($5,2 \pm 0,5$ h) dentre as demais condições analisadas. Uma hipótese que poderia explicar esse maior tempo seria uma possível carga maior de ácidos graxos livres presentes nesta condição, produto da reação de hidrólise dos triacilgliceróis presentes no efluente. Isso pode ter gerado uma inibição inicial da atividade das arqueas metanogênicas, prejudicando a produção de metano.

Quando utilizado o meio contendo o efluente industrial bruto juntamente com células íntegras livres e inóculo granular Dacar[®] (condição 2), foi verificado um menor tempo de adaptação das bactérias anaeróbias e arqueas metanogênicas no processo de biodigestão anaeróbia ($1,3 \pm 0,1$ h), podendo relacionar este fato a uma relação harmônica interespecífica de protocooperação das enzimas lipolíticas oriundas das células íntegras livres com os micro-organismos anaeróbios presentes no inóculo granular, utilizado como ponto de partida do processo de biodigestão anaeróbia.

Valente et al. (2010) estudaram o efeito do pré-tratamento enzimático da gordura do efluente da indústria de pescado, utilizando preparados enzimáticos sólidos, objetivando um aumento da produção de metano no processo de biodigestão anaeróbia. Segundo os autores, a realização do pré-tratamento enzimático não foi significativa com relação a remoção de DQO, porém menores tempos de biodigestão foram alcançados mediante o emprego do pré-tratamento enzimático, atingindo um máximo em 18 horas de processo para o efluente sem pré-tratamento e 8 horas de processo mediante a aplicação deste.

A taxa máxima de produção de metano (R_m) para cada condição é explicada pela inclinação da curva sigmoide evidenciada pela Figura 20. Pode-se verificar que o meio contendo o efluente industrial bruto juntamente com células íntegras livres e inóculo granular Dacar[®] (condição 2) foi o que apresentou maior inclinação. O trabalho mútuo das enzimas lipolíticas e dos micro-organismos anaeróbios responsáveis pelo processo de biodigestão pode ter fornecido uma melhor distribuição de substrato para cada grupo de micro-organismos presentes. Quando comparado com o segundo maior valor da taxa máxima de produção de metano obtida (R_m) (condição 3), a inclinação da curva apresentada pelo meio contendo o efluente pré-hidrolisado enzimaticamente e inóculo granular Dacar[®] é menos acentuada do que a condição 2, porém mais acentuada do que a condição 1 (efluente bruto e inóculo granular Dacar[®]). Após o período de adaptação dos micro-organismos anaeróbios ao meio, verifica-se uma alta taxa de produção de metano quando comparado a condição 1 nas mesmas condições de ensaio.

Em relação a produção máxima de metano (P) obtida para cada condição testada, estes apresentaram valores próximos independente da realização do tratamento enzimático ou não, visto que a produção máxima de metano está diretamente relacionada a fração de carga orgânica inicial disponível, que foi a mesma para cada ensaio realizado. LEAL et al. (2006) verificaram tal comportamento no estudo do efeito do pré-tratamento enzimático sobre o processo de biodigestão anaeróbia, utilizando o efluente da indústria de produtos lácteos como fonte de substrato. O efluente industrial, a uma concentração inicial de O&G (óleos e gorduras) de 1.000 mg/L, foi submetido ao pré-tratamento enzimático, utilizando preparados enzimáticos em estado sólido, sendo posteriormente submetidos ao processo de biodigestão anaeróbia em reatores UASB operados por um período de 240 dias. Ao final do processo de biodigestão, não foram constatadas diferenças significativas com relação a produção máxima de metano para o efluente hidrolisado e para o efluente sem tratamento enzimático, porém houve um incremento da remoção de DQO de 82% para 90%.

Ao fim do processo de biodigestão anaeróbia, os meios reacionais presentes em cada ensaio foram centrifugados e filtrados para posterior realização de análises de pH, bem como análises da Demanda Química de Oxigênio (DQO) de alíquotas do efluente de cada condição como critério de biodegradabilidade do efluente utilizado. A Tabela 11 apresenta dos valores de DQO e pH, anterior e posterior ensaio da AME, para cada condição testada.

Tabela 11 - Caracterização do efluente industrial Bandeira[®] anterior e posterior teste de atividade metanogênica específica (AME) para cada condição analisada.

Parâmetro	1	2	3
DQO inicial (mg/L)	66875±1489	66875±1489	66875±1489
DQO final (mg/L)	35689±1195	42755±1239	36194±1198
Remoção de DQO (%)	46,6	36,1	45,9
pH inicial	7,04±0,01	7,01±0,01	7,04±0,01
pH final	4,36±0,01	4,06±0,01	4,42±0,01

Fonte: Do autor.

A carga orgânica biológica, presente em cada ensaio, depende diretamente da atividade metanogênica do lodo (AME) para que não afete a estabilidade do sistema. Cargas orgânicas presentes nos efluentes superiores a capacidade metanogênica fornecida pelo lodo, poderá conduzir ao acúmulo de ácidos graxos voláteis no meio, diminuindo o pH, tornando-se tóxicos ao consórcio bacteriano (ZEGERS, 1987).

A eficiência e estabilidade do tratamento do soro de leite nas concentrações de DQO de 500, 1.000, 2.000 e 4.000 mg/L, em reatores anaeróbios operados em batelada sequencial (ASBR) com biomassa granulada e agitação foram investigados por Mockaitis et al. (2006), os quais, foram alcançadas remoções de DQO de 86% para as amostras filtradas do efluente posterior tratamento anaeróbio.

De acordo com a Tabela 11, foram obtidas eficiências de remoção de DQO inferiores a 50% para todas as condições analisadas, em um período máximo de biodigestão anaeróbia de 3 dias, podendo atribuir a baixa eficiência de remoção de DQO a alta carga orgânica inicial utilizada nos experimentos, sendo 1.572% superior quando comparada a carga orgânica máxima utilizada por Mockaitis et al. (2006), para um período de biodigestão anaeróbia de 104 dias de operação.

Meios reacionais muito ácidos, apresentando baixo valor de pH, podem inibir a ação de arqueas metanogênicas, impedindo a redução completa da DQO, uma vez que haverá a estabilização do processo anaeróbio na etapa de acidogênese, fato não verificado em processos de biodigestão anaeróbia em meios que apresentam pH's próximos a neutralidade (CAMPOS, 1998).

De acordo com a Tabela 11, todos os meios reacionais ao final do processo de biodigestão anaeróbia apresentaram valores de pH's próximos a 4,0, sendo um possível indicativo de inibição do processo de biodigestão anaeróbia devido ao acúmulo de ácidos graxos voláteis no meio reacional. Esse acúmulo pode levar a diminuição da remoção de DQO (mg/L), influenciando negativamente na eficiência do processo e nos resultados de AME, uma vez que tanto a produção máxima de biogás como a taxa máxima de produção poderiam ser maiores.

Em estudo realizado por Venetsaneas et al. (2009), foi investigada a eficiência de remoção de DQO em efluente da indústria de produtos lácteos durante o processo de biodigestão anaeróbia utilizando reator CSTR operado em dois estágios, com controle de pH e alcalinidade do meio reacional, para um tempo de retenção hidráulica de 20 dias, sendo verificada uma taxa de produção de metano de 1.000 mL/dia e uma remoção de DQO de 95,3%.

Deste modo, pode-se verificar a importância da realização do pré-tratamento enzimático, de efluentes contendo elevados teores de lipídeos, utilizando células íntegras livres de fungos filamentosos, uma vez que houve o indicativo de menores tempos de biodigestão anaeróbia requeridos nos processos que envolveram o pré-tratamento enzimático para uma mesma porcentagem de remoção de matéria orgânica do efluente industrial.

Os ensaios de atividade metanogênica específica do efluente da indústria de produtos lácteos empregando tecnologia híbrida (tratamento enzimático associado ao tratamento biológico) mediante a utilização de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* mostraram um potencial de tratamento ainda não explorado, sendo considerado um importante recurso para o tratamento de efluentes com elevado teor de gorduras, visto que não há menção deste tipo de tratamento presente em literatura.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que as células íntegras de *P. citrinum* URM 4216 apresentam grande potencial como biocatalisador no pré-tratamento de efluentes ricos em lipídeos, indicando benefícios no processo de tratamento biológico convencional. A partir desses resultados, pode-se chegar as seguintes conclusões:

- ✓ A etapa de otimização da produção de lipase ligada ao micélio nas células íntegras livres foi considerada satisfatória pelo incremento da atividade enzimática após investigação dos parâmetros nutricionais e físico-químicos no cultivo celular, encontrando como melhores condições: FC óleo de oliva (30 g/L), FN peptona de soja (70g/L), pH 7,0, temperatura de 30°C e quantidade de inóculo de 1×10^7 esporos do fungo/100 mL de meio de cultura;
- ✓ As células íntegras livres de *P. citrinum* apresentaram eficiência e estabilidade nas reações de hidrólise do soro de leite sintético e do efluente da indústria de produtos lácteos Bandeira[®]. Ao avaliar a influência de diferentes DQO's de soro de leite na atuação das células íntegras livres, verificou-se que o maior valor de hidrólise 97% (ácidos graxos = 298 mM) foi alcançado com DQO 50.000 mg/L (teórica), similar a DQO do efluente industrial que é de aproximadamente 44.000 mg/L;
- ✓ O melhor carregamento enzimático para o soro de leite foi o de 4.500U de atividade fornecida, porém a elevada quantidade de catalisador prejudicou a homogeneização do meio reacional e gerou um novo resíduo sólido. Dessa forma adotou-se o carregamento enzimático de 1.300 U como padrão, o qual foi testado no efluente e apresentou hidrólise de 92,5% ao final de 48h de reação em pH 8,0;
- ✓ As células íntegras imobilizadas em espumas de poliuretano também foram avaliadas na hidrólise enzimática do soro de leite sintético e efluente bruto, porém apresentaram valores inferiores de hidrólise (37 e 50%, respectivamente) em relação a atuação das células íntegras livres, o que pode ter sido causado pela limitação difusional dos substratos para o interior das células em virtude da presença do suporte polimérico;

- ✓ Foram verificados menores tempos de fase lag (λ) nos ensaios envolvendo o emprego simultâneo de células íntegras lipolíticas e inóculo Dacar[®] nos testes de AME e biodegradabilidade do efluente industrial, indicando a hipótese de uma relação interespecífica de protocooperação entre os micro-organismos responsáveis pelo processo de biodigestão anaeróbia. Entretanto, não foram obtidas remoções significativas de DQO do efluente bruto industrial, nos processos que envolvem o pré-tratamento enzimático, quando comparados a porcentagem de remoção de DQO mediante o não emprego do tratamento enzimático por células íntegras livres;
- ✓ Os testes de atividade metanogênica específica envolvendo o pré-tratamento enzimático com células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum* URM 4216 indicaram menores tempos de reação requeridos para uma mesma porcentagem de remoção de DQO do efluente industrial, comprovando o seu potencial de aplicação como parte integrante do processo de biodigestão anaeróbia.

7 SUGESTÕES FUTURAS

A partir dos resultados obtidos do ensaio de determinação da atividade metanogênica específica (AME) e a determinação do potencial de biodegradabilidade do efluente industrial mediante tratamento híbrido, buscar-se-á pela otimização do processo de biodigestão anaeróbia, visando uma estabilidade no pH do processo e a otimização nas relações entre carga de DQO aplicada, lodo e carregamento enzimático com células íntegras, temperatura e pH do processo.

REFERÊNCIAS

- AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.
- ADULKAR, T.V.; RATHOD, V.K. Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 1083–1089, 2014.
- AITKEN, M. D. Waste applications of enzymes: Opportunities and obstacles. **The Chemical Engineering Journal**, v.52, p.B.49-B.58, 1993.
- ANDRADE, G. S. S. et al. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.37, n. 12, p. 2539-2548, 2014.
- ANDRADE, G.S.S. et al. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183-188, 2012.
- American Public Health Association (APHA); American Water Works Association (AWWA); Water Environment Federation (WEF). **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 22 ed. Washington, D.C: APHA, 2012.
- AQUINO, S. F. et al. Metodologia para determinação da atividade metanogênica (AME) em lodos anaeróbios. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v.12, n.2, p.380-389, 2007.
- ARAÚJO, M. E. M. B. et al. Synthesis of structured triacylglycerols enriched in n-3 fatty acids by immobilized microbial lipase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1016-1013, 2016.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 2003. p.369-406.
- BERTOLINO, S. M.; CARVALHO, C. F.; AQUINO, S. F. Caracterização e biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos esgotos produzidos em campus universitário. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v.13, n.3, p.271-277, 2008.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. v.2.
- BROCKMAN, H. L. General features of lypolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: BORGSTROM, B.; BROCKMAN, H. L. **Lipases**. Amsterdam: Elsevier, 1984. p. 3-46.
- CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

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

CAMPOS, C. M. M. **Reatores anaeróbios de última geração**. Lavras: UFLA, 1998. 59 p.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. De; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ano 9, p. 48-57, 2006.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

CARVALHO, G.R. **A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro**. Folheto Circular Técnica, 2010. ISSN 1678-037X.

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios**. 2.ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2007. v.5. 379p.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S.S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química nova**, v. 40, n.1, p. 85-96, 2016.

COSTA, L. V. C. **Biodigestão anaeróbia da cama de frango associada ou não ao biofertilizante obtido com dejetos de suínos: produção de biogás e qualidade do biofertilizante**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2009.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

DHARMSTHITI, S; KUHASNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.21, p75-80, 1998.

DOMINGUES, R.F et al. Effect of enzymatic pretreatment on the anaerobic digestion of milk fat for biogas production. **Food Research International**, v. 73, p. 26 – 30, 2015.

DONG, H.; WANG, Y.; ZHENG, Y. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (S)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida Antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, n. 1-2, p 90-94, 2010.

DORAN, P.M. **Bioprocess engineering principles**. London: Academic Press, 1995.

DUARTE NETO, E. D. et al. **Implementação e avaliação de um biodigestor de produção descontínua**. Belo Horizonte, 2010. 8 p.

DUEHOLM, T. E.; ANDREASEN, K. H.; NIELSEN, P. H. Transformation of lipids in activated sludge. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 165-172, 2001.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Importância econômica:** leite. 2015. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>. Acesso em: 15 set. 2016.

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

FLORENTINO, H. O. et al. Funções sigmoidais aplicadas na determinação da atividade metabólica específica – AME. **Revista Brasileira de. Biometria**, v. 28, n. 1, p. 141-150, 2010.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2–12, 2009.

GERARDI, Michael H. **The microbiology of anaerobic digesters**. Canadá: John Wiley & Sons, 2003. (Wastewater microbiology Series). 188 p.

GOG, A. et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification – current state and perspectives. **Renew. Energy**, v. 39, p. 10 – 16, 2012.

GULDHE, A. et al. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. **Renewable Energy**, v. 85, p.1002-1010, 2016.

GUPTA, S. Comparative study on hydrolysis of oils by lipase immobilized biocatalytic PS membranes using biphasic enzyme membrane reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.4, n. 2, p.1797-1809, 2016.

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

JIN, G. et al. Use of a whole-cell biocatalyst to produce biodiesel in a water-containing system. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 44, n. 1, p. 21-28, 2009.

KAMINI, N. R. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v.92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.

KARADAG, D. et al. A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 262–271, 2015.

KHANAL, S. K. et al., Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2003.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3662-3672, 2011.

LEAL, M. C. M. R. et al. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1173-1178, 2006.

LIMA, R. T. **Production of *Penicillium citrinum* whole cells for application in the hydrolysis of soybean oil**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Poços de Caldas/MG, 2017.

LIMA, R. T. et al. Mycelium-bound lipase production of immobilized whole cell from a wild-type *Penicillium citrinum* strain. **International Journal of Engineering Research & Science**, v.2, p.1-10, 2017.

LIU, Y.; XU, H. L.; YANG, S. F.; TAY, J. H. Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Water Research**, v.37, p.661-673, 2003.

LOO, J.L.; Khoramnia, A.; Lai, O.M.; Long, K.; Ghazali, H.M. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Geotrichum candidum*. **Molecules**, v.19, p. 8556-8570, 2014.

MACEDO, G. A. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação de lipase de *Geotrichum* sp.** 1995. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas/SP, 1995.

MARSHALL, K. R.; HARPER, W. J. The treatment of wastes from dairy industry. In: BARNES, D.L. **Food and allied industries**, London: The Pitman Press, Bath. 1984. v. 1. cap.5, p. 296-376.

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

MENDES, A. A. **Avaliação da Biodegradabilidade de Efluentes com Alto Teor de Lipídeos Previamente Tratados com Enzimas Hidrolíticas**. 2004. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, USP, Lorena/SP, 2004.

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

MENG, Y. et al. Effect of lipase addition on hydrolysis and biomethane production of Chinese food waste. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 452–459, 2015.

MERLIN CHRISTY, P.; GOPINATH, L.R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 167 - 173, 2014.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2016.

MOCKAITIS, G. et al. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. **Journal of Environmental Management**, v. 79, p. 198-206, 2006.

NOGUEIRA, L. A. H. **Biodigestão: a alternativa energética**. São Paulo: Nobel, 1986.

NOTARNICOLA, B. et al. Progress in working towards a more sustainable agri-food industry. **J. Clean. Prod.** v.28, p.1-8, 2012.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolites production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PARZIANELLO, Jorge Eraldo. **Avaliação da biodigestão anaeróbia da mistura de resíduos avícolas e lácteos**. 2011. 36 f. TCC (Graduação em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFP, Pato Branco, 2011.

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

PORTES, Z. A. **Aplicativo computacional para projetos de biodigestores rurais**. 2005. 105 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu/SP, 2005.

QUÉMÉNUER, M.; MARTY, Y. Fatty acids and sterols in domestic wastewater. **Water Research**, v.28, p.1217-1226, 1994.

ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 861-866, 2007.

SAGULA, A. L. **Biodigestão anaeróbia de cama de frango em co-digestão com caldo de cana-de-açúcar**. 2012. 56 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu/SP, 2012.

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

SARAIVA, C. B.; PEREIRA, D. A. Diagnóstico Ambiental de um Laticínio de Pequeno Porte. In: Congresso Latino Americano de Agroecologia, 2., 2009. **Anais**, Curitiba/PR, 2009.

SCHNEIDERS, D. et al. Atividade metanogênica específica (AME) de lodos industriais provenientes do tratamento biológico aeróbio e anaeróbio. **Revista Ambiente & Água**, Taubaté, v. 8, n. 2, p. 135-145, 2013.

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93-100, 2013.

SHARON, C. et al. 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, 1998.

SILVA, A. J. et al. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfatereducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 93-98, 2006.

SOARES, M. S. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de São Paulo, USP, Lorena/SP, 2012.

SUN, T. et al. Improved catalytic performance of GA cross-linking treated *Rhizopus oryzae* IFO 4697 whole cell for biodiesel production. **Process Biochem.**, v.45, p.1192-1195, 2010.

TCHOBANOLOUS, G., BURTON, F.L., STENSEL, H.D. **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

TENG, Y; XU, Y. Culture condition improvement for wholecell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresour Technol.**, v.99, p.3900-3907, 2008.

VALENTE, A.M. et al. Enzymatic hydrolysis of fat from fish industry effluents aimed at increasing methane production. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p.483-488, 2010.

VENETSANEAS, N. et al. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3713-3717, 2009.

VIDAL, G. et al. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewater. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 231-239, 2000.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: UFMG, 2005.

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

WANG, D. et al. Improving mycelium-bound lipase production by aggregating *Rhizopus chinensis* on a draft tube in a modified stirred tank fermentor. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 2019–2028, 2015.

WANG, J. L; WAN, W. Kinetic models for fermentative hydrogen production: a review. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.34, p.3313–3323, 2009.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WANG, Y. et al. Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecistase Ultra). **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1066-1072, 2010.

YANG, X. et al. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochem.**, v.40, p.2095-2103, 2005.

ZEGERS, F. Anaerobic treatment of the wine drawn. In: UNIVERSIDAD DEL VALLE (UV). Corporacion Autonoma Regional Del Cauca. Universidad Agricola de Wageningen. **Arra que y Operacion de Sistemas de Flujo Ascendente com Manto de Lodo (UASB)**. Manual Del Curso, nov. 1987.

ZENG et al. Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.43, p.15-18, 2006.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied Environmental Microbiology**, v.56, p.1875–1881, 1990.