UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ANNA CRISTINA PINHEIRO DE LIMA

ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE RESÍDUO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO VISANDO À PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE GORDURA EM REATORES ANAERÓBIOS

RIO DE JANEIRO

2016

ANNA CRISTINA PINHEIRO DE LIMA

ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE RESÍDUO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO VISANDO À PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE GORDURA EM REATORES ANAERÓBIOS

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientadoras: Profa. Dra. Magali Christe Cammarota
Profa. Dra. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

RIO DE JANEIRO
2016

ANNA CRISTINA PINHEIRO DE LIMA

ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE RESÍDUO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO VISANDO À PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS E SUA APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE GORDURA EM REATORES ANAERÓBIOS

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências

Aprovada em 08 de Março de 2016.

_____

Profa. Dra. Magali Christe Cammarota

_____

Profa. Dra. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

_____

Profa. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite

_____

Prof. Dr. Isaac Volschan Junior

_____

Prof. Dr. Mateus Gomes de Godoy

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe. Mulher forte, guerreira, que me ensina muito sobre tudo. Sua amizade é a mais importante para mim, e sua fé em Deus e no Universo me amparam e me protegem contra todos os males. Mãe, te amo!

Dedico também ao meu pai. Homem íntegro que sempre me apoiou em tudo, principalmente em relação aos estudos. Pode ter certeza que se estou onde estou, foi também por sua causa.

Dedico também à matriarca da família, minha avó, assim como as cinco mulheres que sempre fizeram parte da minha vida e que são minhas inspirações, minhas tias Graça, Regina, Bela e Antônia e minha prima-irmã Ernestina. Eu sempre tive orgulho da história de vida de cada uma e sempre procurei me espelhar nelas para galgar um futuro tão bom quanto o que elas conquistaram. Vocês são mulheres fortes e guerreiras, obrigada por todos os ensinamentos e exemplos. Sei que minha tia Bela está, lá do céu, me protegendo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. A fé Nele, a confiança de que tudo daria certo e que Ele não coloca nada em nossa vida sem uma razão me fizeram sair de Belém, e me aventurar em uma cidade difícil de compreender, mas que, como todos os cariocas, já amo.

Aos meus pais, sem eles eu jamais teria conseguido nem vir para o Rio. Obrigada por todo o incentivo para que eu concluísse mais essa etapa da vida acadêmica. Agradeço também aos meus irmãos Tonny e Marco Antônio, sei que terei sempre vocês ao meu lado.

Agradeço ao meu noivo, pessoa imprescindível em minha vida desde o primeiro instante que nos conhecemos. Muito obrigada pelos momentos bons, e pelos ruins também, que nos fizeram crescer e amadurecer nossa relação. Obrigada por aceitar namorar à distância, e sei que mais cedo do que imaginamos começaremos nossas vidas juntos fisicamente.

Obrigada também aos meus primos/irmãos Luizinho e Cristiano. Somos amigos desde sempre e para sempre seremos. Lui! Obrigada por emanar tantos pensamentos positivos para mim, obrigada por me acalmar e falar “vai dar tudo certo!”. É, está dando tudo certo.

Agradeço também as minhas irmãs/companheiras de casa Aline e Tamires. Obrigada pela paciência, incentivo, risadas e muitas, muitas histórias lindas compartilhadas. Tamis, muito obrigada por ir comigo aos sábados à tarde tirar fermentação, por inúmeras vezes sair tarde do Fundão só para me esperar. Pelas palavras amigas e força, sempre acreditando que tudo ia dar certo e me mostrando que com fé a gente consegue ir bem mais longe do que planejamos. Aline, me ensinou a tranquilidade em meio a tanta pressão. Em tão pouco tempo de amizade já tornou-se tão importante em minha vida. Minha companheira em tudo, desde assuntos acadêmicos até as bagaceiras da vida. Tua força me inspira!

Agradeço as minhas orientadoras Magali e Melissa. Muito obrigada por todos os ensinamentos, principalmente nessa última etapa da escrita da dissertação. Tenho muito orgulho de ser orientada por duas mulheres extremamente competentes, parabéns a vocês duas por serem quem são.

Obrigada pessoal do LabMicro! Manu, Joyce, Tom, Felipe, Douglas, Tay, Bárbara, Vivi, Vítor, Vitória, Aldo e Pedro, vocês foram maravilhosos comigo, sempre me auxiliando, dando suporte, palavras amigas e amor nunca faltaram. Em especial, obrigada Pedro! Tua ajuda física no final dos experimentos foi incrível, nem sei como agradecer por tudo.

Ao pessoal do LTA também meu muito obrigada pela ajuda, a competência de vocês me inspira. Obrigada também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o mestrado.

Enfim, o meu muito obrigada a todos que contribuíram para que eu conseguisse finalizar este trabalho, foram tantas ajudas e tantas pessoas envolvidas que não tem como listar nesse texto.

RESUMO

LIMA, Anna Cristina Pinheiro de. Isolamento de fungos filamentosos de resíduo de estação de tratamento de esgoto visando à produção de enzimas hidrolíticas e sua aplicação na degradação de gordura em reatores anaeróbios. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Um resíduo do tratamento primário de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) foi empregado para isolamento de fungos filamentosos com potencial de produção de lipases e como substrato (em mistura com resíduo da agroindústria - torta de babaçu) em Fermentação no Estado Sólido (FES) para produção de um Preparado Enzimático Sólido (PES) rico em lipases. Dos 27 fungos filamentosos isolados do resíduo da ETE, 8 apresentaram potencial de produção de lipases, através do Índice de Hidrolise (IH). Dois foram selecionados para FES pelo seu maior potencial de produção (IH = 1,5) e identificados como *Aspergillus fumigatus* e *A. terreus*. FES foram conduzidas em estufa a 30°C, com circulação de ar úmido, utilizando 20% (m/m) do resíduo da ETE em mistura com torta de babaçu. Após 48 h de fermentação, obteve-se atividade lipásica, pelo método espectrofotométrico, de 3,9±1,1e de 1,1±0,5 U/g para *A. fumigatus* e *A. terreus*, respectivamente. Nas mesmas condições de fermentação, obteve-se atividade lipásica, pelo método titulométrico com azeite de oliva como substrato, de 21,6 e 18,6 U/g, sendo selecionado o PES obtido pelo fungo *A. terreus* para os testes de hidrólise dos Óleos e Graxas (O&G) presente na escuma diluída em esgoto sanitário, ambos coletados no Centro Experimental de Saneamento Ambiental (CESA)/Escola Politécnica/UFRJ. Cinéticas de hidrólise foram realizadas com diferentes concentrações de escuma/O&G, fixando a atividade enzimática em 0,24 U/mL, verificou-se que em 4 h de hidrólise foram obtidos 21±1, 16±0 e 22±1µmoles/mL de ácidos livres (AL) nas concentrações de 750, 1500 e 3000 mg/L de O&G. Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foram conduzidos em frascos penicilina de 100 mL, a 30°C, fixando a concentração de inóculo (2900 mg SSV/L) e O&G (750 mg O&G/L). Dois ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da forma de aplicação do PES na biodegradabilidade anaeróbia da escuma. O primeiro teste foi a adição direta do PES nos frascos contendo o lodo e a escuma, essa forma foi avaliada com o objetivo de impedir o consumo dos AL, produzidos na hidrólise, pelos micro-organismos presentes na escuma e esgoto (utilizado para diluição da escuma). Neste teste houve produção de biogás (81 mL) porém, este não continha metano (96% CO_2). O segundo ensaio consistiu na adição de uma etapa de hidrólise enzimática com o PES (anteriormente estudada), seguido da mistura escuma e PES para os frascos. Houve produção de biogás (24 mL) entretanto, com baixa concentração de metano (8%). O terceiro ensaio foi realizado a fim de avaliar a adição de diferentes dosagens da escuma (1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100% v/v) bruta (controle) ou hidrolisada na biodegradabilidade anaeróbia do esgoto bruto, uma etapa de sedimentação do PES foi inserida. A remoção de DQO total e a produção de metano aumentaram com a concentração da escuma. No entanto, considerando os valores de DQO final e Produção Específica de Metano (PEM), a diluição de 5% da mistura hidrolisada seria a mais adequada, pois permite maior produção de metano (196 mL CH_4/ $gDQO_{aplicada}$) em relação ao esgoto bruto (133 mL CH_4/ $gDQO_{aplicada}$), sem prejudicar a DQO total final (138 e 134 mg/L).

PALAVRAS CHAVES: Lipase. Hidrólise. Tratamento anaeróbio. Escuma. Esgoto.

ABSTRACT

LIMA, Anna Cristina Pinheiro de. Isolation of filamentous fungi from the sewage treatment seeking production of hydrolytic enzymes from plant residue and its application on the degradation of fats in anaerobic reactors. **Isolamento de fungos filamentosos de resíduo de estação de tratamento de esgoto visando à produção de enzimas hidrolíticas e sua aplicação na degradação de gordura em reatores anaeróbios**. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A primary treatment residue of the Sewage Treatment Plant (STP) was used for isolation of filamentous fungi with lipases production potential and as a substrate (mixed with an agribusiness residu - babassu meal) in Fermentation Solid State (FSS) for the production of a Solid Enzyme Mixture (PES) rich in lipase. Of the 27 filamentous fungi isolated from the ETE residue, 8 showed lipases production potential by Hydrolysis Index (HI). Two were selected for PES for its larger production potential (IH = 1.5) and identified as *Aspergillus fumigatus* and *A. terreus*. FES were conducted in oven at 30 ° C, with a humid air flow, using 20% (m/m) of the STP residue mixed with babassu meal. After 48 h of fermentation, lipase activity was obtained by spectrophotometric method 3.9 ± 1.1 and 1.1 ± 0.5 U/g to *A. fumigatus* and *A. terreus*, respectively. In the same conditions of fermentation, lipase activity was obtained by titration method with olive oil as substrate, reaching 21.6 (*A. fumigatus*) and 18.6 U/g (*A. terreus*), being selected the PES obtained by the fungus *A. terreus* for hydrolysis testing in the oils and Greases (O & G) present in the diluted sewage scum, both collected in the Environmental Sanitation Experimental Center (CESA) / Polytechnic School / UFRJ. Hydrolysis Kinetics were performed with different concentrations of scum / O & G, determining the enzymatic activity of 0.24 U / ml, it was found that at 4 h hydrolysis were obtained 21 ± 1, 16 ± 0 and 22 ± 1 μmoles / ml free acid (LA) at concentrations of 750, 1500 and 3000 mg / L of O & G. Anaerobic biodegradation tests were conducted in 100 ml flasks penicillin, 30 ° C, fixating the inoculum concentration (2900 mg VSS/L) and the O & G (750 mg O & G/L). Two trials were conducted to evaluate the effects by the form of PES application in the scums anaerobic biodegradability. The first test is the direct addition of PES in vials containing the sludge and scum. This first one was evaluated with the aim of preventing the consumption of AL produced in the hydrolysis by the microorganisms present in the scum and wastewater (used for diluting the scum). In this test there was biogas production (81 ml) but did not contain any methane (96% CO2). The second test consisted of adding a step of enzymatic hydrolysis with PES (previously studied), followed by mixing scum and PES to the vials. There was biogas production (24 mL), however, with a low concentration of methane (8%). The third test was performed to evaluate the addition of different dosages of the foam (1, 5, 10, 25, 50, 75 and 100% v/v) raw (control), or hydrolysed in the anaerobic biodegradability of the raw sewage, a part of PES sedimentation was inserted. The removal of the total DQO and the methane production increased with the concentration of the foam. However, considering the final QDO values and Specific Methane Production (MSP), the dilution of 5% of hydrolyzed mixture would be the most suitable because it allows higher production of methane (196 mL CH4/gDQOapplied) relative to the raw sewage (133 ml CH4/gDQOapplied) without harming the DQO final total (138 and 134 mg/L).

KEYWORDS: Lipase. Hydrolysis. Anaerobic treatment. Scum. Sewage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Balanço esquemático de DQO nos sistemas aeróbios e anaeróbios 28
Figura 2.2 – Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia 29
Figura 2.3 – Molécula de Triacilglicerol. 39
Figura 2.4 – Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases. 44
Figura 3.1 – Etapas da pesquisa..... 56
Figura 4.1 – Fungos filamentosos isolados do resíduo da ETE..... 67
Figura 4.2 – Fungos filamentosos isolados do resíduo da ETE com maior IH. 69
Figura 4.3 – Alinhamento genético do fungo M5 com o banco de DNA da empresa MicroID (segundo o laudo o micro-organismo apresenta 95% de identidade com o fungo filamentoso Aspergillus fumigatus). 72
Figura 4.4 – Alinhamento genético do fungo M13 com o banco de DNA da empresa MicroID (segundo o laudo o micro-organismo apresenta 100% de identidade com o fungo Aspergillus terreus). 73
Figura 4.5 – Resíduo proveniente da ETE: (1) Resíduo bruto, conforme recebido no laboratório; (2) resíduo bruto, após separação de sacos plásticos, palitos de pirulitos, entre outros e (3) resíduo peneirado em peneiras do tipo Tyler com granulometria ≤ 1,18 mm. 76
Figura 4.6 – Perfil de produção de lipase pelo fungo A. fumigatus, pelo método espectrofotométrico, pH e umidade durante FES com mistura de torta e resíduo. Médias e desvio-padrão de duas FES conduzidas nas mesmas condições. 77
Figura 4.7 – Fotos tiradas com auxílio de lupa do fungo A. fumigatus crescendo na mistura (resíduo e torta de babaçu) após 72 horas de fermentação. 78
Figura 4.8 – Perfil de produção de lipase pelo fungo A. terreus, pelo método espectrofotométrico, pH e umidade durante FES com mistura de torta e resíduo. Médias e desvio-padrão de duas FES conduzidas nas mesmas condições. 79
Figura 4.9 – Crescimento de A. terreus após 48 horas de fermentação a 30ºC e umidade inicial de 65%. (1) Foto do substrato antes da adição do inóculo; (2) Após 48 horas de fermentação e (3) Foto de um aglomerado de partículas fermentado. 82
Figura 4.10 – Foto tirada com auxílio de lupa do fungo A. terreus crescendo na mistura (resíduo e torta de babaçu) após 72 horas de fermentação. 82
Figura 4.11 – Fluxograma de produção do PES. 83
Figura 4.12 – Estabilidade enzimática do PES do fungo A. terreus. 84
Figura 4.13 – Ponto de coleta do esgoto bruto empregado nos experimentos. 85
Figura 4.14 – Ponto de coleta da escuma empregada nos experimentos. 87
Figura 4.15 – Variação da concentração de ácidos livres com o tempo na hidrólise da ESCUMA contendo 1500 mg/L de O&G com e sem azida. 90
Figura 4.16 - Esquema simplificado de duas formas de aplicação do PES no reator UASB... 95
Figura 4.17 – Esquema simplificado dos experimentos de adição direta de PES e pré-hidrólise seguidas de biodegradação anaeróbia. 97
Figura 4.18 – Frasco penicilina conectado à seringa para medição do biogás no ensaio de biodegradabilidade anaeróbia. 98

Figura 4.19 – Perfil de produção de biogás do controle, mistura com adição direta de PES e mistura hidrolisada por 4 horas. Médias e desvio-padrão de 4 réplicas. 99
Figura 4.20 – Composição do biogás na adição direta do PES e adição da mistura hidrolisada. 99
Figura 4.21 – Representação esquemática dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com diferentes diluições de mistura bruta e hidrolisada em esgoto. 102
Figura 4.22 – Remoção de DQO total (%) para diferentes concentrações de escuma bruta ou hidrolisada adicionadas ao esgoto. A linha verde representa o % remoção obtido com esgoto bruto. 107
Figura 4.23 – Valores de DQO total final para diferentes concentrações de escuma bruta ou hidrolisada adicionadas ao esgoto. A linha verde representa a DQO final obtida com esgoto bruto. 107
Figura 4.24 – Perfil de produção do biogás com adição de 1% (A), 5% (B) e 10% (C) da escuma bruta e hidrolisada no esgoto. 109
Figura 4.25 – Perfil de produção do biogás com adição de 25% (A), 50% (B) e 75% (C) da escuma bruta e hidrolisada no esgoto. 110
Figura 4.26 – Perfil de produção do biogás com adição de 100% da escuma bruta e hidrolisada no esgoto. 111
Figura 4.27 – Concentração de metano (%) no biogás produzido nas diferentes concentrações de escuma bruta e hidrolisada. Linha verde representa o % de metano no Controle (esgoto bruto). 112
Figura 4.28 – Produção Específica de Metano (PEM) em relação à carga de DQO total aplicada, nas diferentes diluições de escuma bruta e hidrolisada no esgoto. Linha verde representa a PEM do Controle (esgoto bruto). 113
Figura A.1 - Correlação obtida entre a concentração de DQO solúvel e Ácidos Livres no teste de hidrólise. 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Características químicas do esgoto doméstico bruto. 22
Tabela 2.2 – Reações das bactérias acetogênicas e a variação da energia livre padrão 31
Tabela 3.1 – Reagentes utilizados nos experimentos 54
Tabela 3.2 – Principais equipamentos utilizados nos experimentos 55
Tabela 4.1 – Índice de Hidrólise dos micro-organismos isolados do resíduo, baseados na relação entre o diâmetro total (halo + colônia) e o da colônia. 69
Tabela 4.2 – Composição química da torta de babaçu 75
Tabela 4.3 – Distribuição granulométrica da torta de babaçu 75
Tabela 4.4 – Caracterização do resíduo do decantador primário da ETE 76
Tabela 4.5 – Comparação de atividade lipásica medida por titulometria e espectrofotometria, pH e umidade em 48 horas de FES da mistura de torta e resíduo com os dois fungos estudados. 81
Tabela 4.6 – Caracterização do esgoto utilizado ao longo do trabalho. 86
Tabela 4.7 – Teste de Hidrólise da ESCUMA na concentração de 750 mg O&G/L com e sem azida. 89
Tabela 4.8 – Concentração de Ácidos Livres inicial e final na hidrólise do controle (sem adição de PES) e ESCUMA, com e sem azida, ambos com concentração de 1500 mg O&G/L. 90
Tabela 4.9 – Teste de Hidrólise na concentração de 3000 mg O&G/L, sem azida. 91
Tabela 4.10 – Valores de Alcalinidade Total e Ácidos Voláteis da ESCUMA, sem azida, nos testes de hidrólise com diferentes concentrações iniciais de O&G. 92
Tabela 4.11 – Concentração de ácidos livres em 0 e 4 h de hidrólise da mistura sob diferentes concentrações de O&G, sem azida. 94
Tabela 4.12 – Resultados dos experimentos de biodegradabilidade anaeróbia com adição direta do PES e Escuma Hidrolisada. 101
Tabela 4.13 – Composição de lodo, esgoto, escuma bruta e hidrolisada nos experimentos. . 103
Tabela 4.14 – Resultados dos ensaios de biodegradabilidade com diferentes diluições de escuma bruta ou hidrolisada no esgoto. 105
Tabela 4.15 – Resumo dos resultados obtidos na digestão anaeróbia de esgoto bruto e 5% de escuma hidrolisada. 114
Tabela B.1 – Valores da fase Lag (dias), Velocidade Máxima de produção de Biogás e tempo de estabilização das misturas brutas e hidrolisadas, bem como o esgoto bruto. 131

LISTA DE SIGLAS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CESAN	Companhia Espírito Santense de Saneamento
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
O&G	Óleos e Graxas
FES	Fermentação no Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
PES	Preparado Enzimático Sólido
CESA	Centro Experimental de Saneamento Ambiental
IH	Índice de Hidrólise

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 15
1.1 INTRODUÇÃO 15
1.2 OBJETIVOS 18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
2.1 ESGOTO DOMÉSTICO: Saneamento básico, características e tratamento 20
2.2 TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ESGOTO 25
2.2.1 Etapas da digestão anaeróbia 29
2.2.1.1 Hidrólise e Acidogênese 29
2.2.1.2 Acetogênese 30
2.2.1.3 Metanogênese 31
2.3 CODIGESTÃO DE RESÍDUOS: Justificativa e aplicações 33
2.4 ÓLEOS E GRAXAS: Definição, formação e remoção de escuma em reatores anaeróbios 39
2.5 LIPASES: Definição, fontes, aplicações e produção por FES 43
2.6 APLICAÇÃO DE LIPASES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE O&G 49
3 MATERIAIS E MÉTODOS 54
3.1 MATERIAIS 54
3.1.1 Produtos químicos 54
3.1.2 Equipamentos 55
3.2 MÉTODOS 56
3.2.1 Métodos analíticos 56
3.2.1.1 Extração das Enzimas 56
3.2.1.2 Quantificação da atividade lipásica por Método Titulométrico 57
3.2.1.3 Quantificação de atividade lipásica por Método Espectrofotométrico 58
3.2.1.4 Umidade 59
3.2.1.5 pH 59
3.2.1.6 Demanda Química de Oxigênio (DQO) 59
3.2.1.7 Óleos e Graxas (O&G) 60
3.2.1.8 Sólidos Totais, Fixos e Voláteis (ST, SFT e SVT) 61
3.2.1.9 Sólidos em Suspensão Totais, Fixos e Voláteis (SST, SSF e SSV) 62
3.2.1.10 Medição e análise da composição de biogás 62

3.2.1.11 Determinação do Teor de Ácidos Livres 63
3.2.1.12 Determinação de Alcalinidade Total 63
3.2.1.13 Determinação de Ácidos Voláteis 64
3.2.1.14 Determinação de Carboidratos Solúveis 65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 66
4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DO RESÍDUO DA ETE 66
4.2 SELEÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS LIPOLÍTICOS 68
4.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES) 74
4.3.1 Resíduos Empregados como Meio Basal na FES 74
4.3.2 Produção de lipases por fungos *Aspergillus fumigatus* e *A. terreus* em FES 76
4.3.3 Obtenção do Preparado Enzimático Sólido (PES) 83
4.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA 85
4.4.1 Caracterização do Esgoto Sanitário e da Escuma 85
4.4.2 Condução do processo e Resultados da Hidrólise Enzimática 87
4.5 FORMAS DE APLICAÇÃO DO PES 94
4.5.1 Efeito da forma de aplicação do PES na biodegradabilidade anaeróbia da escuma: adição direta do PES e pré-hidrólise enzimática 96
4.5.2 Avaliação de diferentes dosagens de escuma na biodegradação anaeróbia de esgoto 102
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES 115
5.1 CONCLUSÕES 115
5.2 SUGESTÕES 116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 117
APÊNDICE – A 130
APÊNDICE – B 131

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Dentro de uma Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) há, basicamente, quatro etapas de tratamento: preliminar, primária, secundária e terciária; e em todas elas pode ocorrer geração de subprodutos sólidos, tais como: material gradeado, areia, escuma, lodo primário, lodo secundário e lodo químico (caso haja uma etapa físico-química). O tratamento desses subprodutos é uma etapa essencial do tratamento de esgotos (ANDREOLI et al., 2001).

Em uma ETE o tratamento primário consiste em decantadores primários, nos quais materiais menos densos que a água, tais como óleos e graxas (O&G), flotam na superfície e sólidos com maior densidade decantam. Estes materiais sólidos separados são chamados, respectivamente, de escuma e lodo primário (VON SPERLING, 2005). Já no tratamento secundário, ocorre a remoção de matéria orgânica pelos micro-organismos, por via aeróbia (na presença de oxigênio dissolvido) ou anaeróbia (na ausência de oxigênio) (CHERNICHARO, 2007).

Sendo gerado no tratamento primário, o lodo primário bruto é constituído de sólidos suspensos sedimentáveis removidos por sedimentação em tanques sépticos ou decantadores primários. Estes sólidos podem exalar um forte odor caso fiquem retidos por muito tempo nos sistemas (VON SPERLING, 2005). Constituída de materiais flutuantes, a escuma pode ter origem nos desarenadores, decantadores primários e secundários, lagoas de estabilização e nos reatores anaeróbios. A escuma contém sólidos com densidade específica menor que a do esgoto, sendo um dos seus principais constituintes os O&G, além de sabões, restos de alimentos, cascas de frutas e vegetais, papel, algodão e materiais similares (CHERNICHARO, 2007).Esses materiais causam diversos problemas operacionais nas estações, caso não sejam retirados, tais como entupimento de redes, dutos e reservatórios, pois se solidificam nas tubulações transformando-se em blocos que se fixam nas paredes das mesmas, reduzindo o espaço

para passagem do esgoto; além de mau cheiro, transbordamento de fossas e caixas de gordura (CESAN, 2013; NUVOLARI, 2011).

Para evitar essa problemática, municípios brasileiros sancionaram leis municipais que estabelecem a obrigatoriedade de residências, comércios e, principalmente, restaurantes de indústrias ou comerciais instalarem caixas de gordura para evitar uma elevada concentração deste composto nos esgotos (BRASIL, 2009; BRASIL, 2010; CESAN, 2013). Os esgotos domésticos são constituídos, em sua maioria, de proteínas (40%), carboidratos (25 a 50%), óleos e graxas (10%), entre outros compostos em menor quantidade. Apesar de os O&G representaram apenas 10% dos sólidos, estes possuem baixo coeficiente de biodegradabilidade, portanto acumulam na superfície de reatores aeróbios e anaeróbios formando uma camada de sólidos, a escuma (MENDES et al., 2005; VON SPERLING, 2005). As características da escuma gerada nos reatores dependem das características do esgoto. Alguns reatores anaeróbios, como o reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB), apresentam retentores de escumas que periodicamente são retiradas, na maioria das vezes manualmente, e levadas para tratamento.

Pela Política Nacional de Resíduos Sólidos este material não pode ser levado para aterros sanitários sem tratamento, pois como são constituídos de elevada concentração de matéria orgânica, estas necessitam ser estabilizadas para, então, serem dispostas nos aterros. Uma vez que os hábitos da população tendem para um consumo maior de óleos e graxas, a concentração destas substâncias tende a aumentar no esgoto, gerando assim maiores produções desses sólidos de difícil degradação na etapa biológica do processo (HE et al., 2015).

Desta forma, um pré-tratamento que auxilie na degradação da gordura presente nos esgotos, permitindo uma melhor atuação da população microbiana no tratamento biológico seria interessante. Dentre os diferentes processos de pré-tratamento existentes, a utilização de enzimas (lipases) é vista como uma boa alternativa, uma vez que estas são catalisadores eficientes que hidrolisam especificamente óleos e graxas. A utilização de lipases (triacilglicerolacilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) leva à redução dos níveis de sólidos suspensos e lipídeos, o que possibilita melhores condições de operação no tratamento biológico e aumento da vida útil dos equipamentos devido à desobstrução

das tubulações. Sendo assim, a aplicação de uma tecnologia combinada (tratamento enzimático associado ao tratamento biológico) mostra-se como uma alternativa eficiente de tratamento, reduzindo os impactos ambientais gerados sobre os recursos hídricos (MENDES et al., 2005; VALLADÃO et al., 2007).

No entanto, para tornar a utilização de enzimas economicamente viável, faz-se necessário reduzir o custo de sua produção. A Fermentação no Estado Sólido (FES) é uma alternativa viável para produção de enzimas, pois se baseia no aproveitamento do resíduo gerado nas ETE como substrato. A FES é uma tecnologia de fermentação envolvendo o crescimento dos micro-organismos em matérias-primas sólidas com ausência (ou quantidade limitada) de água livre (PANDEY, 2003; PINTO et al., 2005).É uma técnica milenar que, com o advento de novas tecnologias empregando micro-organismos e utilizando resíduos gerados em atividades antrópicas, oferece inúmeras vantagens para a produção de enzimas (PANDEY, 2003; SCHMIDELL et al., 2001).

A aplicação dessa tecnologia combinada (tratamento enzimático associado ao tratamento biológico anaeróbio) no tratamento de esgotos domésticos visa à realização da hidrólise enzimática da escuma acumulada na superfície do reator anaeróbio como etapa de pré-tratamento, utilizando um *pool* de enzimas hidrolíticas. Após a hidrólise, a escuma hidrolisada deve ser misturada à corrente de esgoto que alimenta o reator. Esta escuma hidrolisada, em contato com o lodo, aumenta a carga de matéria orgânica alimentada e, possivelmente, a produção de biogás, predominantemente composto por metano. A utilização desta tecnologia combinada aplicada ao tratamento de efluentes de indústrias alimentícias vêm sendo muito estudada por vários grupos de pesquisa pelo mundo, obtendo bons resultados (DUARTE et al., 2015; LEAL et al., 2006; MOBARAK-QAMSARI et al., 2012; VALENTE et al., 2010), porém sua utilização no tratamento de esgoto doméstico ainda não foi devidamente avaliada.

Outro aspecto abordado no trabalho foi a utilização do resíduo gerado no tratamento primário de uma ETE para isolamento dos micro-organismos e como fonte de substrato para FES. Dada a vasta presença de micro-organismos nesse resíduo, a seleção de cepas microbianas selvagens, com elevada capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, é uma alternativa vantajosa do ponto de vista econômico, uma vez

que o próprio resíduo pode ser empregado para crescimento dos micro-organismos e produção das enzimas na fermentação. Como os micro-organismos são adaptados aos substratos, estas produziriam biocatalisadores com as características desejadas para sua aplicação nas escumas produzidas na própria estação de tratamento.

1.2 OBJETIVOS

- **Objetivo Geral**

Empregar um resíduo oriundo do decantador primário de uma Estação de Tratamento de Esgoto para isolamento de fungos filamentosos e produção, por Fermentação no Estado Sólido, de um Preparado Enzimático Sólido (PES) rico em lipases e avaliar sua aplicação no pré-tratamento da escuma, seguido de tratamento biológico anaeróbio visando ao aumento da produção de metano e à redução de problemas operacionais.

- **Objetivos específicos**

Isolar fungos filamentosos presentes em resíduo oriundo do decantador primário de uma Estação de Tratamento de Esgoto;

Avaliar o potencial de produção de lipase dos fungos filamentosos isolados do resíduo por método de seleção em placa;

Avaliar a produção de um *pool* enzimático rico em lipases por Fermentação no Estado Sólido (FES) empregando os fungos isolados do resíduo, utilizando como meio basal torta de babaçu e o resíduo coletado no decantador primário;

Avaliar a hidrólise da escuma formada na etapa do tratamento preliminar, empregando o *pool* enzimático produzido por FES selecionado na etapa anterior;

Avaliar a biodegradabilidade anaeróbia, em frascos penicilina, da escuma com adição direta do *pool* enzimático;

Avaliar a biodegradabilidade anaeróbia, em frascos penicilina, da mistura de esgoto com diferentes concentrações da escuma bruta ou previamente hidrolisada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESGOTO DOMÉSTICO: Saneamento básico, características e tratamento

Saneamento básico é considerado, segundo a lei n° 11.445 que estabelece as diretrizes nacionais para o saneamento básico, como um conjunto de serviços, infraestruturas e instalações operacionais de abastecimento de água potável, esgotamento sanitário, limpeza urbana, manejo dos resíduos sólidos e das águas pluviais urbanas bem como sua drenagem (BRASIL, 2007); além de apresentar como primeiro princípio fundamental desses serviços a universalização do acesso. A noção de universalização remete à possibilidade de todos os brasileiros poderem alcançar uma ação ou serviço de que necessite, sem qualquer barreira de acessibilidade, seja legal, econômica, física ou cultural(BRASIL, 2013).

Os padrões de qualidade para as águas no Brasil são estabelecidos pela Resolução n°430, de 13 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA - sendo uma das principais legislações vigentes na área de controle da poluição hídrica. Esta Resolução define esgotos sanitários "como uma denominação genérica para despejos líquidos residenciais, comerciais, águas de infiltração na rede coletora, os quais podem conter parcela de efluentes industriais e efluentes não domésticos" (CONAMA, 2011). Já o decreto n° 7.217, de 21 de junho de 2010, estabelece a responsabilidade do setor público em relação ao esgotamento sanitário, definindo as atividades consideradas serviços públicos oferecidos pelo governo. Dentre esses serviços estão a coleta, transporte, tratamento e disposição final do esgoto e dos lodos originados na operação de unidades de tratamento coletivas ou individuais, inclusive fossas sépticas (BRASIL, 2010).

O saneamento é feito para garantir a saúde, segurança e bem-estar da população, evitando as ameaças decorrentes da presença de contaminantes, detritos, resíduos, patógenos ou substâncias tóxicas em geral. Entretanto, segundo o IBGE (2011), em relação à eficiência e qualidade dos serviços de saneamento oferecidos nos municípios do Brasil, houve um avanço muito pequeno, principalmente em se tratando do

esgotamento sanitário. Segundo a PNSB (Pesquisa Nacional de Saneamento Básico) dados do censo demográfico de 2010 apontam que aproximadamente metade da população brasileira dispõe seus esgotos domésticos em redes coletoras de esgoto ou de águas pluviais. Portanto, em relação à proporção da população do Brasil, 48% dos brasileiros possuem condições adequadas para disposição de seus dejetos, como coleta de esgoto ou fossa séptica, enquanto o restante da população (52%) lança seus excretas em redes não interligadas a unidades de tratamento, em fossas rudimentares, diretamente nos rios, lagos, mar (ou outro escoadouro) ou não tem banheiro ou sanitário. Assim, 42 milhões de habitantes realizam o lançamento de seus esgotos sanitários no ambiente de forma inadequada, gerando problemas não só de saúde pública, mas também de qualidade da água dos corpos receptores para usos como o próprio abastecimento humano (BRASIL, 2013).

Os esgotos domésticos são constituídos de água (99,9%) e sólidos (0,1%), sendo esta fração composta de materiais orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, bem como micro-organismos. As águas residuárias apresentam diversos compostos químicos, porém em se tratando da elaboração de projetos e execução de uma ETE, normalmente não há interesse em se determinar cada um desses constituintes. Portanto, a utilização de parâmetros indiretos, que traduzam o caráter ou potencial poluidor do despejo, é preferível uma vez que estes são testes laboratoriais mais fáceis de executar.

A Tabela 2.1 apresenta as características químicas do esgoto doméstico bruto, em relação aos parâmetros indiretos. A determinação dos sólidos de um esgoto é importante para traduzir o caráter ou potencial poluidor de um despejo pois, com exceção dos gases dissolvidos, todos os contaminantes presentes nestes contribuem para a carga de sólidos. Os sólidos totais de um esgoto doméstico podem ser classificados de acordo com:

- Seu tamanho e estado: sólidos em suspensão ou dissolvidos;
- Características químicas: sólidos fixos ou voláteis;
- Sedimentabilidade: sólidos em suspensão, sedimentáveis ou não sedimentáveis.

Tabela 2.1 – Características químicas do esgoto doméstico bruto.

Parâmetro	Concentração		
	Unidade	**Faixa**	**Típico**
SÓLIDOS TOTAIS	mg/L	700 – 1350	1100
Em suspensão	mg/L	200–450	400
Fixos	mg/L	40–100	80
Voláteis	mg/L	165–350	320
Dissolvidos	mg/L	500–900	700
Fixos	mg/L	300–550	400
Voláteis	mg/L	200–350	300
Sedimentáveis	ml/L	10– 20	15
MATÉRIA ORGÂNICA			
DBO_5	mg/L	250–400	300
DQO	mg/L	450–800	600
NITROGÊNIO TOTAL	mg N/L	35–60	45
Nitrogênio orgânico	mg N/L	15–25	20
Amônia	mg NH_3-N/L	20–35	25
Nitrito	mg NO_2^--N/L	0	0
Nitrato	mg NO_3^--N/L	0 – 1	0
FÓSFORO	mg P/L	4–15	7
Fósforo orgânico	mg P/L	1–6	2
Fósforo inorgânico	mg P/L	3–9	5
pH		6,7–8,0	7,0
ALCALINIDADE	mg$CaCO_3$/L	100–250	200
CLORETOS	mg/L	20–50	35
ÓLEOS E GRAXAS	mg/L	55–170	110

Fonte: Von Sperling (2005).

Dentre os sólidos, os voláteis representam uma estimativa da matéria orgânica, enquanto os fixos ou inertes representam a matéria inorgânica ou mineral (VON SPERLING, 2005). Dentre as características químicas, a matéria orgânica é um parâmetro de suma importância devido os impactos ambientais que acarreta nos corpos hídricos receptores dos esgotos (AIYUK et al., 2006). Dos parâmetros globais de

caracterização dos efluentes, a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) é o que expressa a concentração desses sólidos orgânicos. A concentração de DBO para esgoto sanitário se encontra na faixa de 250 a 400 mg/L, sendo esta, geralmente, constituída de proteínas (40%), carboidratos (25 a 50%), óleos e graxas (10%) e, em menor quantidade, ureia, surfactantes, fenóis, pesticidas e outros (MENDES et al., 2005; VON SPERLING, 2005). Dentro desta composição, os lipídeos apresentam um baixo coeficiente de biodegradabilidade e, apesar de representarem apenas 10% dos sólidos presentes nos esgotos, podem causar, caso não haja um tratamento adequado, problemas de poluição tanto na água quanto no solo (OLIVEIRA et al., 2014).

Segundo a CESAN (2013), as gorduras e o lixo são os principais problemas dentro de uma estação de tratamento de esgotos. Os óleos e graxas (O&G) se solidificam nas paredes das tubulações, transformando-se em blocos sólidos, reduzindo o espaço para passagem do esgoto. Alguns municípios do Brasil, como Rio de Janeiro e Curitiba, sancionaram leis municipais que estabelecem a obrigatoriedade de instalação de caixas de gordura em residências, comércios e, principalmente, restaurantes de indústrias ou comerciais, para evitar o entupimento da tubulação da rede (BRASIL, 2009; BRASIL, 2010; CESAN, 2013).

Além das características químicas do esgoto doméstico também são importantes as características físicas, como: temperatura, cor, turbidez e odor; e microbiológicas, como a presença de bactérias, fungos, protozoários, helmintos e vírus (VON SPERLING, 2005). O tratamento adequado de esgotos tem, como finalidade principal, corrigir características indesejáveis, possibilitando que sua disposição final ocorra de acordo com regras e critérios definidos pelas autoridades legislativas e com a qualidade mínima exigida para o descarte (SOARES et al., 2001). Para alcançar essa condição ideal, o sistema de tratamento de esgoto é constituído de uma série de operações e processos, sendo usualmente classificado através dos seguintes níveis: Preliminar; Primário; Secundário e Terciário (apenas usualmente) (VON SPERLING, 2005).

Através de mecanismos físicos, o tratamento preliminar objetiva a remoção de sólidos grosseiros e areia através de grades, peneiras rotativas, estáticas ou trituradores e desarenadores. O tratamento primário destina-se à remoção de sólidos em suspensão sedimentáveis e sólidos flutuantes. O esgoto, ao sair do tratamento preliminar, ainda contém sólidos em suspensão não grosseiros que podem ser parcialmente removidos em

unidades de sedimentação. A etapa primária do tratamento utiliza mecanismo físico (sedimentação) aliado, algumas vezes, a mecanismos químicos com adição de agentes coagulantes (sulfato de alumínio ou cloreto férrico) para aumentar a eficiência de remoção de DBO e sólidos em suspensão, em torno de 25 a 35% e 60 a 70%, respectivamente (VON SPERLING, 2005).

Os esgotos fluem vagarosamente através dos decantadores primários, permitindo que os sólidos em suspensão, possuindo densidade maior que a do líquido circundante, sedimentem gradualmente no fundo. Essa massa de sólidos é denominada lodo primário bruto. Já os materiais flutuantes, como óleos e graxas, tendo menor densidade que o líquido circundante, flotam na superfície do decantador, onde são coletados e removidos do tanque para posterior tratamento (VON SPERLING, 2005).

O principal objetivo do tratamento secundário é a remoção de matéria-orgânica. Por meio de processos biológicos, essa etapa visa acelerar os mecanismos de degradação que ocorrem naturalmente nos corpos receptores. Assim, a decomposição dos poluentes orgânicos degradáveis é alcançada, em condições controladas, em intervalos de tempo menores do que nos sistemas naturais (VON SPERLING, 1996). Essa remoção ocorre inteiramente por mecanismos biológicos, utilizando organismos vivos dentro de reatores, com a finalidade de transformar a matéria orgânica sob a forma de sólidos dissolvidos e em suspensão, em compostos simples como sais minerais, gás carbônico e água.

O processo de metabolização da matéria orgânica pode ocorrer por duas vias: aeróbia e anaeróbia. A via aeróbia ocorre na presença de oxigênio dissolvido e é conduzida por uma população de micro-organismos que estabelecem entre si complexas interações ecológicas. As bactérias aeróbias são as principais responsáveis pela remoção do material orgânico, entretanto fungos, protozoários e micrometazoários também fazem parte da microfauna e atuam no funcionamento dos sistemas biológicos de tratamento (DEZOTTI, 2008). Os micro-organismos oxidam a matéria orgânica produzindo dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), sendo a oxidação bioquímica por via aeróbia mais exotérmica do que a via anaeróbia, como pode ser observado nas Reações 1 e 2 de oxidação da glicose abaixo reproduzidas (DEZOTTI, 2008 e VON SPERLING, 2005).

Aerobiose: $6\ O_2 + C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$ -649 cal/mol (1)

Anaerobiose: $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 3\ CO_2 + 3\ CH_4$ -34 cal/mol (2)

Já nos processos anaeróbios, as bactérias degradam os compostos orgânicos biodegradáveis, na ausência de oxigênio dissolvido, gerando compostos solúveis, insolúveis e gases como CO_2e metano (CH_4) (CHERNICHARO, 2007). O metano é uma molécula orgânica quimicamente estável e sua conversão é realizada por arqueas metanogênicas. Por ser um gás insolúvel, este é separado da fase líquida dentro dos reatores anaeróbios, possibilitando assim, a remoção do carbono orgânico, além de possuir elevado potencial energético disponível (BRAILE, CAVALCANTI, 1993).

Com a crescente preocupação com as mudanças climáticas associadas à utilização de combustíveis fósseis, a digestão anaeróbia vem se tornando uma tecnologia sustentável e ambientalmente segura para o tratamento de efluentes. Processos anaeróbios produzem o biogás (mistura de metano e dióxido de carbono) como uma fonte de energia renovável e consomem menos energia para sua operação quando comparados aos sistemas aeróbios, além de gerarem um volume menor de sólidos biológicos, o lodo (CHAN et al., 2009). Esses sistemas de tratamento devem atender alguns aspectos importantes, tais como: remoção da matéria orgânica e, portanto, redução da DBO; a degradação de compostos químicos orgânicos recalcitrantes e fornecimento de um efluente em condições que não afetem o equilíbrio do sistema receptor final (rios e lagos) (MENDES et al., 2005).

2.2 TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ESGOTO

A via anaeróbia pode ser empregada para degradação de todos os compostos orgânicos, sendo que o processo torna-se mais eficiente e econômico quando as substâncias são facilmente biodegradáveis (CHERNICHARO, 2007). Até a década de 1970 a aplicação dos processos anaeróbios no tratamento das águas residuárias limitava-se apenas à estabilização do lodo gerado na etapa aeróbia, e sua utilização era considerada antieconômica e problemática. Este fato se deve, principalmente, à

velocidade de conversão da matéria orgânica ser baixa, acarretando elevados tempos de retenção hidráulica (TRH) nos biodigestores. Entretanto, a crise energética no Brasil na década de 70 e o incremento de pesquisas nessa área aumentaram o interesse pela aplicação desta tecnologia, com o consequente desenvolvimento de "sistemas de alta taxa", tornando o TRH independente do tempo de retenção celular (TRC), diminuindo o primeiro e mantendo o segundo em valores elevados (DEZZOTTI, 2008; CHERNICHARO, 2007; LIMA et al., 2002).

Atualmente, a digestão anaeróbia tem sido muito utilizada, tanto para tratar resíduos sólidos quanto efluentes oriundos de indústrias agrícolas, alimentícias e de bebidas. Devido ao seu potencial em estabilizar resíduos de culturas agrícolas, dejetos de animais, lodos de ETE e lixo urbano, estima-se que milhões de digestores anaeróbios tenham sido construídos em todo o mundo (CHERNICHARO, 2007).

No que tange ao tratamento de esgotos domésticos, a utilização da tecnologia anaeróbia vêm crescendo, notadamente através dos reatores tipo UASB (CHERNICHARO, 2007). Essa tecnologia torna-se bem mais atrativa para os países de clima tropical e subtropical nos quais as temperaturas são acima de 20°C, devido aos micro-organismos anaeróbios apresentarem baixa atividade em temperaturas inferiores a 20°C e pela inviabilidade de aquecimento dos reatores. Portanto, a temperatura dos esgotos influencia a utilização deste processo (AIYUK et al., 2006).

A digestão anaeróbia apresenta algumas vantagens fundamentais em comparação com as tecnologias de tratamento aeróbio, tais como:

- A possibilidade de trabalhar com elevadas concentrações de matéria orgânica. Enquanto em sistemas aeróbios é desejável uma Demanda Química de Oxigênio (DQO) menor que 1000 mg/L, nos sistemas anaeróbios pode-se trabalhar com concentrações em torno de 4000 mg/L (CHAN et al., 2009);
- Produção de metano, que pode ser usado como fonte de energia para o aquecimento no local e eletricidade, devido ao seu poder calorífico (35.793 kJ/m^3, a 1 atm, 0°C) o que equivale a 1 kg de carvão cru ou 0,76 kg de carvão padrão (SERRANO et al., 2013);

- Baixa produção de sólidos, cerca de cinco a dez vezes inferior à produção dos sistemas aeróbios, fato este devido à taxa de crescimento microbiano ser reduzida (AIYUK et al., 2006; DEZZOTI, 2008);
- Baixo consumo de energia, visto que não necessitam de energia para aeração (DEZZOTI, 2008);
- Baixos custos de implantação e operação, possibilidade de operação com elevados tempos de retenção de sólidos e baixos tempos de retenção hidráulica.

As principais desvantagens do tratamento anaeróbio, em relação ao aeróbio, são:

- A insatisfatória remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) – porém, quando se trata da aplicabilidade no tratamento de resíduos, isso torna-se uma vantagem pois, após a digestão,este por conter elevada concentração desses nutrientes, possibilitando sua utilização como fertilizante (CHERNICHARO, 2007; JABŁOŃSKI et al., 2015);
- O fato de a DQO residual ser elevada, acarretando em efluentes de qualidade inferior, não atendendo os restritos limites de lançamento estabelecidos na legislação ambiental, necessitando de tratamento biológico ou químico posterior (a Figura 2.1 exemplifica a diferença entre as remoções de DQO) (CHAN et al., 2009; DEZOTTI, 2008);
- Elevada instabilidade dos reatores devido a choques de carga orgânica e hidráulica, presença de compostos tóxicos ou ausência de nutrientes (CHERNICHARO, 2007);
- Longos tempos de partida do sistema para desenvolver biomassa ativa.

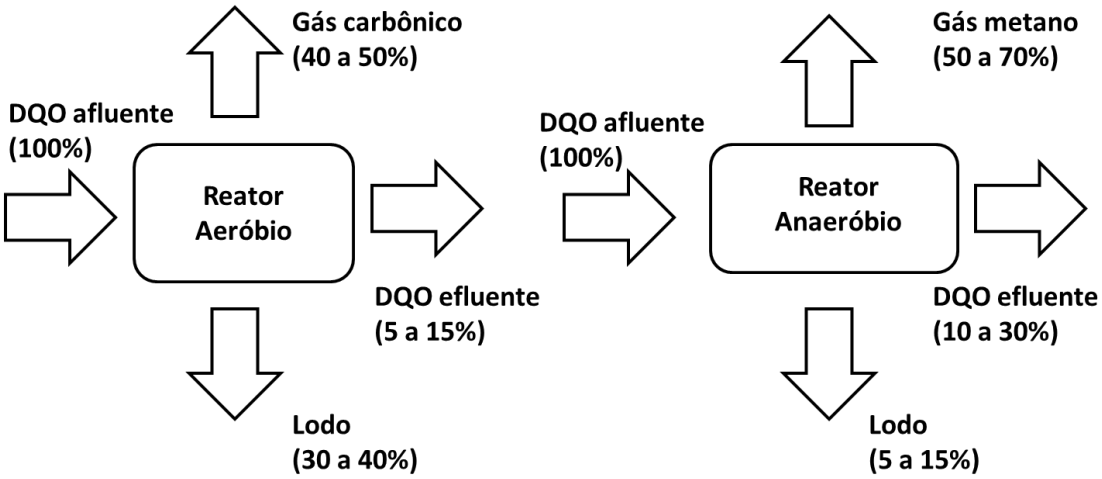


Figura 2.1 – Balanço esquemático de DQO nos sistemas aeróbios e anaeróbios

(Fonte: CHERNICHARO, 2007).

Para a degradação da matéria orgânica em biorreatores anaeróbios, quatro processos distintos ocorrem: hidrólise, na qual acontece a degradação de macromoléculas (carboidratos, proteínas e lipídeos) em compostos mais simples; acidogênese, onde ocorre a transformação dos compostos mais simples em ácidos orgânicos voláteis; acetogênese, na qual bactérias acetogênicas transformam todos os ácidos voláteis em acetato, dióxido de carbono (CO_2) e gás hidrogênio (H_2); e a metanogênese, onde a obtenção do metano se faz a partir da descarboxilação do acetato e/ou da redução do CO_2 com H_2 (CHERNICHARO, 2007). A Figura 2.2 exemplifica as rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.

No processo de digestão anaeróbia os micro-organismos presentes atuam em sinergia para conversão da matéria orgânica complexa em metano, gás carbônico, gás sulfídrico e amônia, além de novas células microbianas. Para entendimento da microbiologia do processo as três primeiras etapas são divididas, porém em um reator anaeróbio essa divisão não acontece, cada grupo microbiano depende da ação do outro (LIMA et al., 2002).

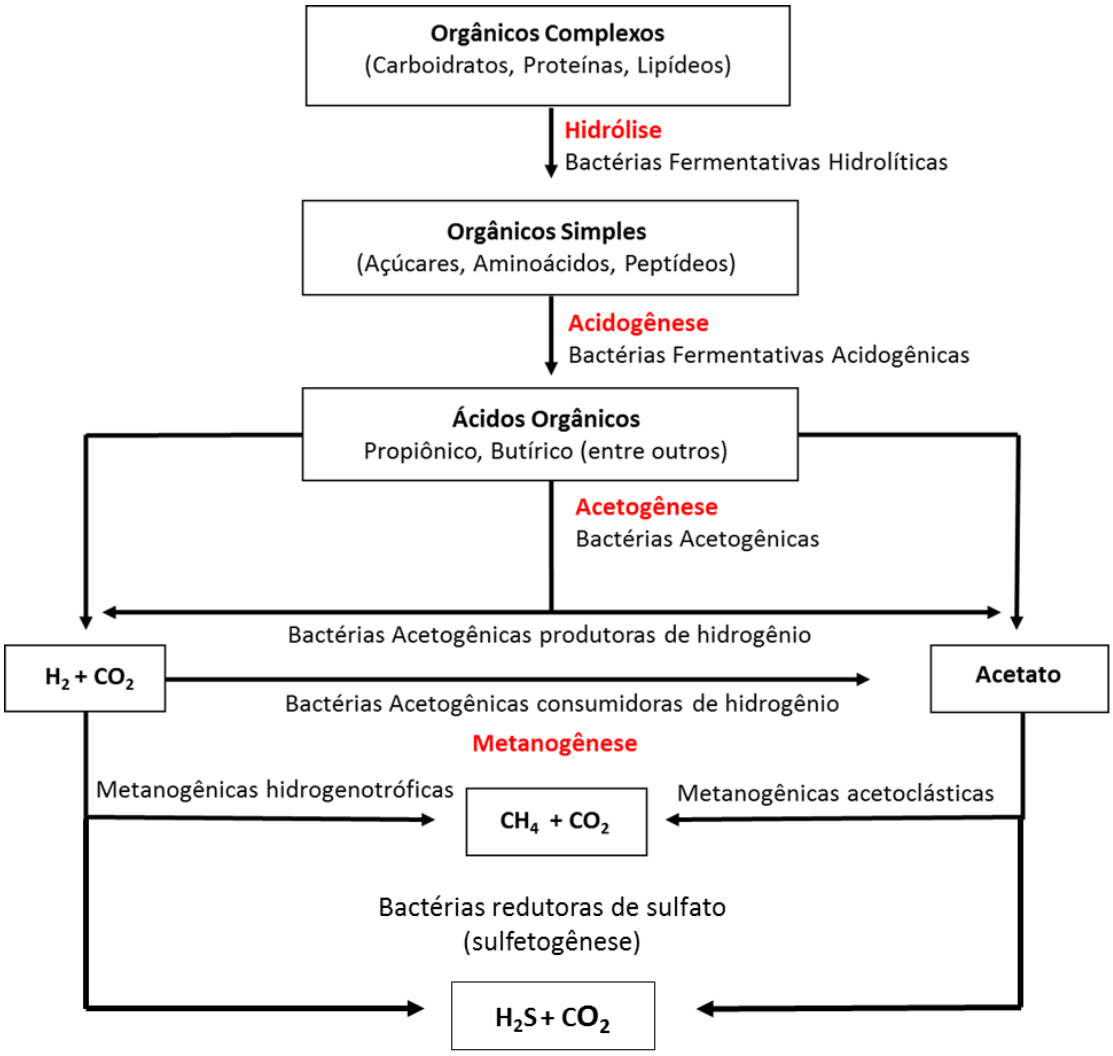


Figura 2.2 – Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia

(Fonte: CHERNICHARO, 2007).

2.2.1 Etapas da digestão anaeróbia

2.2.1.1 Hidrólise e Acidogênese

Nesta etapa ocorre a hidrólise da matéria-orgânica particulada (carboidratos, proteínas e lipídeos) pelas bactérias fermentativas, com produção de compostos orgânicos dissolvidos mais simples (moléculas menores). Uma vez que as bactérias não

são capazes de assimilar moléculas orgânicas complexas, esta etapa é necessária para que elas tenham acesso ao substrato dentro da célula (LIMA et al., 2002). Bactérias fermentativas hidrolíticas produzem e excretam para o meio enzimas extracelulares, denominadas exoenzimas (celulases, amilases, proteases, lipases, entre outras) e estas hidrolisam as macromoléculas a monômeros que, sendo moléculas orgânicas dissolvidas, podem atravessar as paredes celulares desses micro-organismos (CHERNICHARO, 2007).

Uma vez no interior da célula, esses produtos solúveis são metabolizados através do metabolismo fermentativo de bactérias fermentativas acidogênicas. Esse grupo de micro-organismos produz diversos compostos mais simples, tais como: ácidos graxos voláteis de cadeia curta (acético, propiônico e butírico), álcoois (etanol), cetonas (acetona), dióxido de carbono e hidrogênio, além de novas células bacterianas (CHERNICHARO, 2007). Embora existam bactérias acidogênicas facultativas e aeróbias, a grande maioria destas são anaeróbias (ANDREOLI et al., 2001).

2.2.1.2 Acetogênese

Nesta etapa, bactérias sintróficas acetogênicas utilizam os ácidos graxos voláteis (propionato e butirato) e outros compostos orgânicos formados na etapa anterior (acidogênese) como substratos, produzindo ácido acético e hidrogênio gasoso (H_2) (ANDREOLI et al., 2001; LIMA et al., 2002). Dois grupos tróficos de organismos estão envolvidos nesta fase: as bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio (BAHP) e as bactérias homoacetogênicas consumidoras de hidrogênio.

O principal produto da fermentação das moléculas orgânicas intermediárias é o acetato, apesar de poucas espécies de arqueas serem capazes de sintetizar metano a partir deste produto, sendo responsáveis por aproximadamente 70% da produção deste gás (ANDREOLI et al., 2001; AIYUK et al., 2006). Além disso, a remoção de DQO da fase líquida depende da conversão do acetato em metano, pois cerca de 60 a 70% dos elétrons do substrato original são canalizados para produção de acetato

(CHERNICHARO, 2007). As bactérias responsáveis pela produção de acetato sobrevivem em simbiose com as arqueas metanogênicas, que só ocorrem naturalmente nos reatores anaeróbios devido a essa interação.

A Tabela 2.2 apresenta algumas reações realizadas pelas bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio e suas respectivas energias livres padrões liberadas (pH igual a 7 e pressão de 1atm); como é observado, as reações acetogênicas não são termodinamicamente favoráveis nas condições padrões ($\Delta G^{\circ}>0$). Portanto, caso os produtos das reações estejam presentes no sistema nas mesmas concentrações indicadas pela reação, estes a deslocarão no sentido de produção dos substratos. Como o acetato é imprescindível para as arqueas metanogênicas acetoclásticas, o equilíbrio da reação é indispensável para o sistema. Para que ocorra a produção de acetato é necessário que o hidrogênio esteja presente no sistema em concentrações baixas. Sendo assim, logo após sua síntese, este deve ser rapidamente consumido pelas bactérias consumidoras de hidrogênio (bactérias homoacetogênicas e hidrogenotróficas). Ademais, a produção de acetato resulta na produção de grandes quantidades de H_2, fazendo com que o pH do meio decresça (CHERNICHARO, 2007).

Tabela 2.2 – Reações das bactérias acetogênicas e a variação da energia livre padrão

Reação						**ΔG° (KJ/mol)**
Bicarbonato	→	Acetato	2HCO3- + 4H2 + H+	→	CH3COO- + 4H2O	+104,6
Proprionato	→	Acetato	CH3CH2COO- + 3H2O	→	CH3COO- + HCO3- + H+ + 3H2	+76,1
Butirato	→	Acetato	CH3CH2CH2COO- + 2H2O	→	2 CH3COO- + H+ + 2H2	+48,1
Etanol	→	Acetato	CH3CH2OH + H2O	→	CH3COO- + H+ + 2H2	+9,6
Lactato	→	Acetato	CH3CHOHCOO- + 2H2O	→	CH3COO- + HCO3- + H+ + 2H2	-4,2

(Fonte: CHERNICHARO, 2007).

2.2.1.3 Metanogênese

Ocorre, nesta etapa, a conversão do acetato, H_2 e CO_2 a metano (CH_4). Na digestão anaeróbia a oxidação do substrato inicial é incompleta e os produtos finais da fermentação, excretados no meio, ainda são moléculas orgânicas parcialmente oxidadas (CH_4). Podem, portanto, ser utilizadas como substrato oxidável por outros organismos.

Entretanto, ocorre a remoção da matéria orgânica nos digestores devido à baixa solubilidade do gás metano, que é transferido para a atmosfera (LIMA et al., 2002; VON SPERLING, 2005). As arqueas metanogênicas são as responsáveis por esta etapa. Atualmente classificados dentro do domínio *Archaea*, estes micro-organismos são anaeróbios estritos e em geral estão presentes em ambientes nos quais aceptores de elétrons como O_2, NO_3^-, Fe^{3+} e $SO_4^=$estão ausentes ou em baixas concentrações (CHERNICHARO, 2007).

O processo de digestão anaeróbia utilizado no tratamento de efluentes e resíduos é uma representação tecnológica do que ocorre de forma natural nos pântanos, sedimentos anóxicos e no trato gastrointestinal de ruminantes e outros animais (GRANT, LONG, 1989). Há um número limitado de substratos que as arqueas metanogênicas utilizam, sendo esses: ácido acético, hidrogênio/dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas e monóxido de carbono. O aceptor final de elétrons para esses micro-organismos pode ser o gás carbônico, ou o grupo metil de compostos C-1, ou o carbono do grupo metil do acetato (CHERNICHARO, 2007).

As arqueas são divididas em dois grupos principais, e isso ocorre devido à sua fisiologia e substrato para síntese de metano, sendo estes (CHERNICHARO, 2007):

- **Metanogênicas acetoclásticas**, que usam o acetato como fonte de carbono e energia, produzindo gás carbônico e metano. Apesar de existirem poucas espécies capazes de sintetizar metano a partir do acetato, estes são normalmente os micro-organismos predominantes na digestão anaeróbia. Formam metano a partir do grupo metil do ácido acético, e são responsáveis por cerca de 60-70% deste gás. Fazem parte desse grupo dois gêneros principais: *Methanosarcina e Methanosaeta*.
- **Metanogênicas hidrogenotróficas**, que utilizam o gás carbônico como fonte de carbono e aceptor final de elétrons, e o hidrogênio como fonte de energia (este funciona como agente redutor). Nestas circunstâncias, parte do gás carbônico reage com o hidrogênio para produzir metano, o qual produz uma força próton-motiva na membrana, para sintetizar ATP. Praticamente todas as arqueas metanogênicas são capazes de produzir metano a partir do hidrogênio e gás carbônico, produzindo energia.

As reações catabólicas da metanogênese acetotrófica e hidrogenotrófica estão representadas nas Reações 3 e 4 abaixo descritas, respectivamente (DEZOTTI, 2008).

$$CH_3\,COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- \quad (3)$$

$$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O \quad (4)$$

Os esgotos domésticos são bem mais diluídos que os efluentes industriais, resultando em baixas taxas de produção volumétricas de gás metano, o que torna antieconômica sua utilização como fonte de energia para aquecimento (CHERNICHARO, 2007). De maneira geral, são vários os subprodutos gerados no tratamento de esgotos: material gradeado, areia, escuma, lodo primário, lodo secundário e lodo químico (caso haja uma etapa físico-química). O tratamento e destino final destes resíduos é de responsabilidade da própria estação geradora, e alternativas para seu aproveitamento vêm sendo estudadas por vários grupos de pesquisa no mundo inteiro (ANDREOLI et al., 2001).

No intuito de aumentar a produção de biogás dentro das ETE à adição destes resíduos nos reatores pode ser uma alternativa viável. A codigestão anaeróbia tem sido considerada uma forma eficaz de conversão da matéria orgânica em energia renovável, sendo empregadas matérias-primas de baixo custo e comercialmente flexíveis, agregando valor ao tratamento (GARCIA-GEN, RODRIGUEZ, LEMA, 2014, 2015; GUOet al., 2014; LI et al., 2011).

2.3 CODIGESTÃO DE RESÍDUOS: Justificativa e aplicações

A partir da Lei n° 12.305, de 2 de agosto de 2010, foi instituída a Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) que dispõe diretrizes relativas à gestão integrada e ao gerenciamento de resíduos sólidos, identificando assim as responsabilidades dos geradores destes e do poder público. Direcionando a responsabilidade da destinação ambientalmente adequada aos resíduos gerados, esta política é uma importante solução

para um dos principais problemas ambientais, sociais e econômicos decorrentes do manejo inadequado dos resíduos sólidos (BRASIL, 2010).

Sancionada em 2010, o prazo para que as cidades se adequassem a PNRS era de quatro anos, ou seja, 2014. No entanto, pelo Projeto de Lei do Senado (PLS 425/2014), foram estabelecidos novos prazos, escalonados de acordo com a realidade dos municípios. As cidades com população inferior a 50 mil habitantes terão prazo maior (2021) enquanto as capitais e municípios de regiões metropolitanas terão até 31 de julho de 2018 para acabar com os lixões, e os municípios de fronteira e que contam com mais de 100 mil habitantes, com base no Censo de 2010, terão um ano a mais para implementar os aterros sanitários. As cidades que têm entre 50 e 100 mil habitantes terão prazo até 31 de julho de 2020 (BRASIL, 2014).

Com a extinção dos lixões e implantação dos aterros sanitários, os resíduos gerados, por pessoas físicas ou jurídicas, por meio de suas atividades não poderão mais ser descartados sem tratamento prévio. Portanto, a partir de implantada esta lei, apenas rejeitos deverão ser encaminhados para os aterros sanitários. Segundo a PNRS, “Rejeitos são resíduos sólidos que, depois de esgotadas todas as possibilidades de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis, não apresentem outra possibilidade que não a disposição final ambientalmente adequada” (BRASIL, 2010).

São instrumentos da PNRS a cooperação técnica e financeira entre os setores públicos e privados para o desenvolvimento de pesquisas de novos produtos, métodos, processos e tecnologias de gestão, reciclagem, reutilização, tratamento de resíduos e disposição final ambientalmente adequada de rejeitos, além de pesquisas científicas e tecnológicas nessa área. Seus principais objetivos são (BRASIL, 2010):

- Proteção da saúde pública e da qualidade ambiental, estimulando padrões de produção e consumo de bens e serviços com adoção, desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias limpas, como forma de minimizar os impactos ambientais;

- Não geração, redução, reutilização, reciclagem e tratamento dos resíduos sólidos, bem como disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos;

- Incentivo à indústria da reciclagem, tendo em vista fomentar o uso de matérias-primas e insumos derivados de materiais recicláveis e reciclados;

- Gestão integrada de resíduos sólidos, por meio de articulações entre as diferentes esferas do poder público, e destas com o setor empresarial, com vistas à cooperação técnica e financeira;

- Capacitação técnica continuada na área de resíduos sólidos;

- Integração dos catadores de materiais reutilizáveis e recicláveis nas ações que envolvam a responsabilidade compartilhada pelo ciclo de vida dos produtos;

- Incentivo ao desenvolvimento de sistemas de gestão ambiental e empresarial voltados para a melhoria dos processos produtivos e ao reaproveitamento dos resíduos sólidos, incluídos a recuperação e o aproveitamento energético.

Portanto, os resíduos orgânicos gerados em agroindústrias, dentro das ETE, lixos municipais, entre outros, devem ser estabilizados primeiramente para em seguida serem dispostos nos aterros sanitários. A técnica de codigestão anaeróbia vem sendo muito estudada por vários grupos de pesquisa como uma forma de tratamento destes resíduos (DONOSO-BRAVO, FDZ-POLANCO, 2013; GARCÍA-GEN, RODRÍGUEZ, LEMA, 2013, 2014; GUO et al., 2014; PEIXOTO, 2013; PONTES, 2003; SANTOS, 2010; SANTOS, 2014; SERRANO et al., 2013).

O termo codigestão anaeróbia significa a digestão simultânea de dois ou mais resíduos orgânicos. São várias as vantagens em comparação à digestão de um único resíduo, tais como: melhoria de nutrientes e da relação C/N, diluição de compostos tóxicos e inibitórios, efeito sinérgico dos micro-organismos presentes na degradação de ambos os substratos, aumento da carga de matéria orgânica biodegradável, maior rendimento de produção de biogás e metano, além da utilização de um mesmo processo para tratar dois resíduos, não comprometendo ainda mais os custos de investimento (GARCÍA-GEN et al., 2015; GUO et al., 2014).

A adição de resíduos orgânicos como cossubstratos na digestão anaeróbia mostra-se uma alternativa eficaz e de baixo custo para valorização destes, além de auxiliar a gestão dos resíduos e melhorar a produção de biogás (LI et al., 2011). Vários

são os resíduos que podem ser empregados como cossubstratos, tais como: resíduos com elevada concentração de óleos e graxas gerados em indústrias e ETE, lodos de ETE, esterco e resíduos agroindustriais (LAUWERS et al., 2013).

A proporção da mistura dos substratos e cossubstratos no processo de digestão anaeróbia é imprescindível para garantir que os principais parâmetros avaliados no processo estejam dentro do intervalo de operação adequado. Ensaios laboratoriais são realizados com o objetivo de avaliar a biodegradabilidade e produção de metano em diferentes proporções de misturas de resíduos (GARCÍA-GEN, RODRÍGUEZ, LEMA, 2014). Testes laboratoriais denominados Potencial Bioquímico de Metano (PBM) são utilizados por muitos pesquisadores para avaliar a produção de metano ao longo da digestão anaeróbia. Li et al. (2011) utilizou esse teste para estudar a viabilidade de empregar dois resíduos orgânicos como cossubstratos na digestão anaeróbia do lodo excedente do processo de lodos ativados: um resíduo sintético de cozinha e outro sintético com elevada concentração de óleos e graxas (GOG). O primeiro experimento teve por objetivo alcançar a razão ideal substrato/inoculo (S/I) para ambos os cossubstratos, sem adição do lodo excedente: para o resíduo de cozinha os valores foram 0,80 – 1,26 e para GOG 0,25 – 0,75. Após esse primeiro teste, a codigestão de resíduo com lodo ativado foi testada, obtendo-se um aumento na produção de metano utilizando os dois resíduos, de 117 mL/g SVT (somente o resíduo do lodo ativado) para 418 mL/g SVT utilizando o GOG e 324 mL/g SVT para o resíduo de cozinha. A partir de uma regressão não linear concluiu-se que a adição dos cossubstratos diminuiu a fase *lag* da biodegradação orgânica de 81,8 horas (somente o resíduo do lodo ativado) para 28,3 horas com o GOG e 3,9 horas com o resíduo de cozinha. Sendo, portanto, a utilização destes resíduos viável para aumentar a produção de metano no processo.

A codigestão de lodo de esgoto e gordura animal foi estudada por Gea et al. (2007). Os autores obtiveram redução de gordura de 85% em 69 dias de experimento, quando utilizou 30% de massa seca do resíduo em testes pilotos. Essa pesquisa concluiu que a umidade é um fator crítico no processo, uma vez que há atividade biológica e lipolítica nos reatores. Um monitoramento da produção de lipasesdurante o processo de compostagem também foi realizado na pesquisa acima e sua caracterização em termos de estabilidade térmica (38,3°C) e pH (7,97) foram estabelecidas.

A adição de enzimas hidrolíticas na digestão anaeróbia do lodo primário produzido na ETE foi estudado por Roman, Burgess e Pletschke (2006) com o objetivo de avaliar sua estabilização. Experimentos conduzidos em laboratórios empregando uma concentração de 0,03% (v/v) de solução de celulase e pronase E, ambas enzimas comerciais, foram adicionados aos frascos contendo 500 mL do lodo, incubados em shaker (40°C, 200 rpm) por 120 horas. Os autores encontraram que a mistura de enzimas (celulase e pronase E) adicionadas no reator reduziu 80% dos sólidos presentes, 93% da DQO particulada e 97% da DQO total, em contrapartida ao controle que obteve remoções, para esses mesmos parâmetros, respectivamente, 20%, 59% e 63%.

A aplicação direta dos resíduos em sistemas de alta taxa também é uma alternativa para seu tratamento. Em seu trabalho, inserido na rede de pesquisa do Programa de Pesquisas em Saneamento Básico (PROSAB), Peixoto (2013) avaliou a codisposição de resíduos de fossas e tanques sépticos no desempenho do Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente (UASB), na cidade de Itumbiara-Goiás.

A autora avaliou a concentração de O&G nestes resíduos, havendo variabilidade nos resultados: 25% das amostras obtiveram concentrações de 136 mg/L e 75% atingiram 347 mg/L. A taxa de aplicação dos resíduos no reator foi variada de 0,17 a 0,51% (m/v), além de se estudar uma etapa de flotação da gordura no tratamento preliminar, antes do lançamento destes no UASB.O estudo teve duração de 12 meses e um monitoramento dos parâmetros foi realizado. Em comparação a um reator controle, a adição dos resíduos não alterou os parâmetros do esgoto efluente em relação a DQO total, sólidos suspensos totais, fixos e voláteis, sólidos sedimentáveis e O&G (PEIXOTO, 2013).

Concentrações máximas de lipídeos no efluente foram de 232 mg/L com 0,17% e 222 mg/L com 0,51% de resíduos adicionados. Essas concentrações foram as mesmas encontradas no controle, mostrando assim que a adição destes resíduos não eleva a concentração final de O&G no sistema. Em relação ao pH, ambos os reatores mantiveram efluentes com valores de pH próximos da neutralidade. A autora explica essa neutralidade nos reatores devido à taxa de aplicação volumétrica (0,17 a 0,51%) dos resíduos descartados não originarem grandes concentrações de matéria orgânica, consequentemente os ácidos voláteis formados foram consumidos pelas arqueas

metanogênicas, não permanecendo no sistema. A etapa de flotação da gordura antes de seu lançamento na corrente afluente do reator UASB mostrou-se desnecessária, uma vez que as concentrações de O&G foram semelhantes às encontradas no esgoto sem essa etapa (PEIXOTO, 2013).

Através de testes estatísticos, a autora comprovou que a disposição dos resíduos nos reatores UASB não apresentou diferença significativa, tanto na qualidade do efluente final quanto na operação e manutenção dos reatores. Portanto, a conclusão deste estudo foi que o UASB é uma alternativa viável para a codisposição destes resíduos, porém é necessário estabelecer alguns critérios nas ETE, tais como: a taxa de aplicação dos resíduos, o local na ETE onde será lançado o resíduo, estrutura física e de pessoal e determinar parâmetros de relevância para o monitoramento dos resíduos antes da codisposição (PEIXOTO, 2013).

Uma patente foi desenvolvida por Carlos Alberto Soares e registrada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI em 26/12/2013 sob o título “SEML – Sistema de Mistura de Escuma e Lodo”, esse processo e equipamento proposto baseia-se em um equipamento automatizado para a mistura, recirculação e incorporação da escuma formada na superfície dos separadores trifásicos do UASB ao lodo digerido dentro do reator, para sua remoção e destinação adequada em processos de tratamento de esgoto. Tendo em vista a recirculação da escuma gerada 24 horas por dia, sem perda da estabilidade física e orgânica da manta de lodo e com menores perdas do biogás gerado, este processo caracteriza-se pelo conjunto de canaletas tipo “coifa em 60º”, sistema de tubulação, registros e conexões, conjunto moto-bomba e sistema de limpeza ou aspersão de água ou o próprio esgoto tratado. A patente proposta possibilita duas alternativas de recirculação, a primeira é caracterizada pela recirculação, mistura e incorporação da escuma gerada no topo dos reatores ao lodo digerido, sendo removidos em conjunto por descartes periódicos; a segunda alternativa caracteriza-se pela recirculação da escuma para a parte inferior do reator, abaixo da manta de lodo, utilizando tubulação mestra constituída de derivações com registro de retorno, compatíveis com o mesmo posicionamento do ponto de chegada dos esgotos afluentes no fundo do reator.

A utilização de resíduos lipídicos com elevado teor de O&G em sistemas anaeróbios pode resultar em incremento na produção de biogás e metano, quando

comparados com proteínas e carboidratos (SUNADA, 2015). A etapa de hidrólise é considerada limitante quando se trata da digestão anaeróbia de resíduos sólidos ou efluentes com elevada concentração de sólidos (GUO et al., 2014). Portanto, alguns trabalho descrevem pré-tratamento com adição de enzimas para promover a pré-hidrólise (DONOSO-BRAVO, FDZ-POLANCO, 2013 e GUO et al., 2014).

2.4 ÓLEOS E GRAXAS: Definição, formação e remoção de escuma em reatores anaeróbios

Os triacilgliceróis são os componentes básicos dos O&G, sendo os mais abundantes na natureza, contém três moléculas de ácidos graxos esterificadas nos três grupos hidroxila do glicerol. Podem ser simples, contendo apenas um tipo de ácido graxo, ou mistos, que apresentam dois ou três tipos (Figura 2.3) (LEHNINGER, NELSON, COX, 2006; ORDÓÑEZ, 2005).

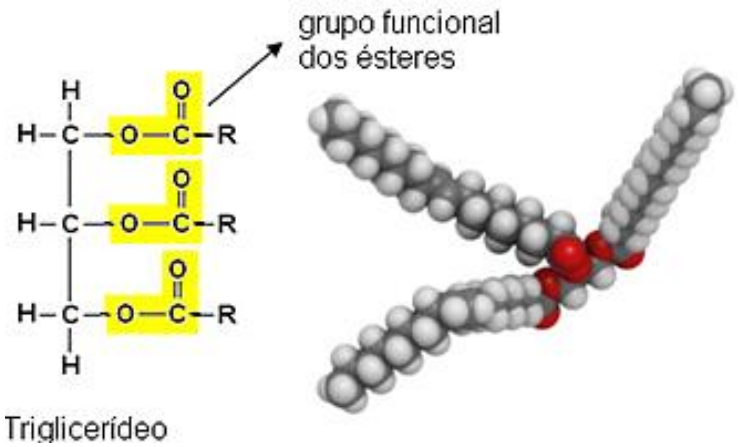


Figura 2.3 – Molécula de Triacilglicerol.

Fonte: ORDÓÑEZ, 2005.

No esgoto doméstico várias são as fontes de O&G, destacando-se: pias e ralos domiciliares, restaurantes, detergentes domésticos, fritura e processamento industrial de alimentos (HE et al., 2015).A composição química de um esgoto doméstico e, consequentemente, a concentração de óleos e graxas, podem variar dependendo da dieta populacional e do grau de desenvolvimento do país. Segundo Williams et al. (2012), o

consumo per capita desses compostos em países desenvolvidos é de 50kg/a enquanto nos países menos desenvolvidos permanece em torno de 20kg/a. Entretanto, com o intenso grau de globalização e a tendência de se seguir a dieta do ocidente, esses compostos estão se tornando um problema global quando se trata de saneamento básico, sendo seus mecanismos de remoção mais complexos no que tange à coleta e tratamento (WILLIAMS et al., 2012).

Óleos e graxas podem se apresentar no esgoto predominantemente em duas formas: livres ou emulsionados e sua descarga no meio ambiente é devidamente regulamentada no Brasil pela Resolução CONAMA nº 430, sendo o limite para lançamento nos corpos hídricos de 100 mg/L após o tratamento dos esgotos sanitários (BRASIL, 2011).

Elevadas concentrações de O&G são tóxicas para os ambientes aquáticos, uma vez que além de acarretar problemas de origem estética, diminuem a área de contato entre a superfície da água e o ar atmosférico, impedindo, dessa maneira, a transferência do oxigênio da atmosfera para a água. Além disso, em seu processo de decomposição, os óleos e graxas reduzem o oxigênio dissolvido (CETESB, 2009). Já nas ETE essas substâncias causam sérios problemas na eficiência do tratamento, tais como: geração de compostos intermediários durante sua biodegradação; produção e acúmulo de escuma; flotação e lavagem do lodo; diminuição da carga ativa (biomassa); toxicidade e efeitos inibitórios sobre os micro-organismos (JUNQUEIRA, 2014). Somente a etapa de tratamento biológico, tanto aeróbio quanto anaeróbio, não é suficiente para levar essas concentrações aos níveis de descarte exigido pela legislação ambiental (NAKHLA et al., 2003), necessitando de uma etapa de pré-tratamento para sua remoção.

Essas substâncias tendem a formar blocos sólidos e insolúveis nas linhas de esgoto, reduzindo significativamente o fluxo do efluente, ou por vezes bloqueando-o completamente, causando quebra das tubulações e transbordamento das linhas (HE et al., 2015; WILLIAMS et al., 2012). Segundo Williams et al. (2012), no Reino Unido mais de 25000 ocorrências de inundações por ano são devido ao bloqueio das tubulações de esgoto, sendo 50% atribuídas aosO&G. Já nos EUA esses resíduos são responsáveis por 47% dos transbordamentos da rede coletora de esgoto devido a bloqueios da linha (HE et al., 2015).

Vários grupos de pesquisas em saneamento básico no mundo iniciaram estudos sobre os mecanismos de formação e remoção de O&G. Keener et al. (2008), analisando as propriedades físicas e químicas de 23 amostras destes resíduos nos EUA, concluíram que todas elas apresentaram características bem distintas, não havendo nenhuma ligação entre as propriedades químicas do esgoto e o resíduo. O único metal encontrado em concentrações elevadas nos esgotos que pode estar relacionado com a formação da escuma são os sais de cálcio que, reagindo com os lipídeos, promovem sua saponificação. Sendo estes insolúveis, precipitam e acumulam nas tubulações. A partir dessa informação, He et al. (2015) estudou a biodegradação do palmitato de cálcio sob várias condições redox, tais como: aeróbias, redução por nitrato e sulfato, além de condições metanogênicas. Sob condições aeróbias e redução por nitrato ocorreu biodegradação, porém para as condições de redução por sulfato e metanogênicas esse composto foi recalcitrante.

Nas ETE essas substâncias afetam diretamente a etapa biológica do processo devido à baixa cinética de biodegradabilidade. Em sistemas aeróbios, a presença de O&G tem um impacto negativo quanto à eficiência de transferência de oxigênio para o meio, principalmente em processos de lodos ativados, onde a presença desta substância aumenta o crescimento de *Nocardia amarae*, que causa formação de escuma (JEGANATHAN, BASSI, NAKHLA, 2006).

Sob condições anaeróbias, ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido oleico, produto da hidrólise dos triacilgliceróis, têm efeito inibitório sobre os micro-organismos (NAKHLA et al., 2003), além dessas substâncias se adsorverem na superfície do lodo, o que pode limitar o transporte de substratos solúveis para a biomassa, diminuindo assim a taxa de conversão do substrato em produto.

Os produtos da hidrólise dos O&G são: o glicerol, ácidos graxos saturados e insaturados. Estudos apontam o glicerol como sendo não tóxico e sem efeito inibitório para os micro-organismos envolvidos na digestão anaeróbia. Entretanto, os ácidos graxos saturados e insaturados são conhecidos como produtos tóxicos e inibitórios para as bactérias anaeróbias, além de diminuírem a disponibilidade de ATP (Adenosina Trifosfato) (MENDES et al., 2005). A dupla ligação em um ácido graxo natural é sempre do tipo cis e esse fator, associado à quantidade de insaturações na molécula, determina seu maior efeito inibitório. Os AGV (Ácidos Graxos Voláteis) são tóxicos

para as arqueas metanogênicas somente na sua forma não ionizada. Cerca de 99% dos AGV estão na sua forma ionizada (não tóxica) em valores de pH entre 6,7 e 8,0, valores esses geralmente desejáveis em tratamentos anaeróbios. Porém, quando ocorre uma acidificação do meio e o pH diminui esses ácidos estão menos desassociados (tóxicos). A um pH em torno de 5, os AGV estarão aproximadamente 50% dissociados (PEREIRA, CAMPOS, MOTERANI, 2009).

Os ácidos graxos são incorporados, dentro da célula microbiana, a complexos lipídicos como membrana plasmática ou catabolizados para formação de compostos de baixa massa molar (CO_2, CH_4 e H_2O). As reações de oxidação desses ácidos ocorrem em série de quatro, sendo catalisadas por enzimas, que clivam dois átomos de carbono por vez, a partir do terminal carboxílico de um ácido graxo (Reação 5) até a completa degradação e formação do produto (acetil-CoA). A reação de degradação dos ácidos graxos é denominada β-oxidação e o mecanismo é mostrado no esquema a seguir (MENDES et al., 2005):

$$CH_3(CH_2)_nCOOH + 2H_2O \rightarrow CH_3(CH_2)_{n-2}COOH + CH_3COOH + 4e^- + 4H^+ \quad (5)$$

Para cada molécula de AGCL degradada, é formada uma molécula de ácido graxo com dois átomos de carbono a menos e uma de ácido acético, liberando quatro elétrons e quatro íons hidrogênio. Esses elétrons são transportados por aceptores no interior das células microbianas como FADH (Flavina-Adenina-Dinucleotídeo) e NADH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo) e utilizados para a formação de duas moléculas de gás hidrogênio, como apresentado na Reação 6 (MENDES et al., 2005):

$$4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2 \quad (6)$$

Nas estações de tratamento, geralmente ao longo das etapas os O&G tendem a se separar da fase líquida acumulando-se na superfície de diversas unidades tais como: decantadores primários, lagoas de estabilização, fossa séptica, decantadores secundários, digestores de lodo e reatores UASB (CHERNICHARO, 2007; METCALF e EDDY, 1991; TAKENO, YAMAOKA, SASAKI, 2005; VON SPERLING, 1997) e esse acúmulo ocorre devido à sua degradação biológica ser lenta (VALENTE et al., 2010). Esse material acumulado é denominado escuma e apresenta massa específica menor que a da água (1,0 g/cm^3), por isso é impulsionado à superfície dos reatores pelas

bolhas de gás (CHERNICHARO, 2007; GERARDI, 2003). Von Sperling (2005) define escuma como sendo materiais flutuantes raspados da superfície, contendo óleos e graxas (óleos vegetais e minerais, gordura animal), sabões, resíduos de comida, cascas de vegetais e frutas, cabelo, algodão, papel, pontas de cigarro e materiais similares, e estão presentes em desarenadores, decantadores primários e secundários, lagoas de estabilização e reatores anaeróbios.

A quantidade de escuma e suas características vão depender do esgoto efluente, em termos de presença de sólidos suspensos e de quantidade de óleos e graxas (CHERNICHARO, 2007). Segundo Souza et al. (2006), embora a escuma seja sempre relatada como um sério problema operacional, poucos estudos foram focados em seu equacionamento e as informações sobre o assunto são escassas.

Alguns sistemas apresentam retentores superficiais de escuma, onde está se deposita, tornando sua remoção algo frequente, porém o grande entrave desta técnica é a disposição final deste resíduo. Algumas empresas o encaminham para aterros sanitários ou, dependendo do volume produzido, para valas escavadas na própria ETE. No entanto, os aterros não estão mais aceitando este resíduo devido às suas características químicas (CHERNICHARO, 2007; VAN HAANDEL, LETTINGA, 1994) e em futuro próximo, de acordo com a PNRS, os aterros estarão proibidos por lei de receber tais resíduos (BRASIL, 2010).

2.5 LIPASES: Definição, fontes, aplicações e produção por FES

As lipases são classificadas como hidrolases (triacilglicerolacil-hidrolases, EC 3.1.1.3) membros da família serina hidrolase que atuam na interface orgânica-aquosa – fenômeno conhecido como ativação interfacial, catalisando a hidrólise de ligações ésteres dos triacilgliceróis, gerando diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres (Figura 2.4) (CONTESINI et al., 2010; JEGANATHAN et al., 2006; KUMAR et al., 2011; LI, ZONG, 2010; RIGO et al., 2012).

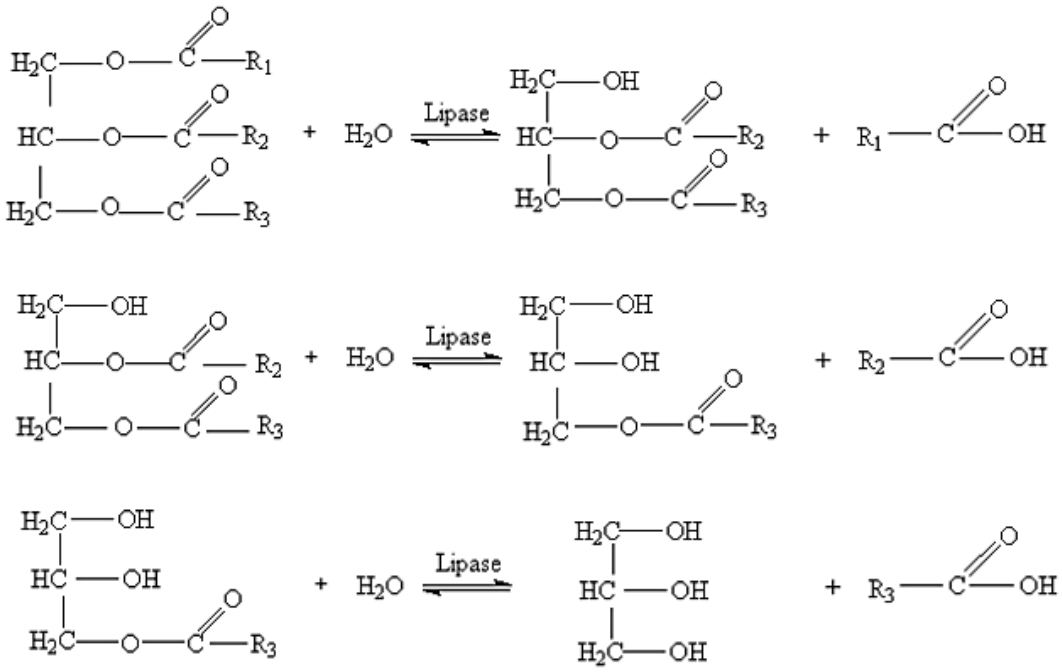


Figura 2.4 – Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases.

Fonte: (MENDES et al., 2005).

Em ambientes aquorestritos, pode ocorrer a reação síntese reversa, possibilitando diversas reações de bioconversão, tais como: esterificação, transesterificação e interesterificação em sistemas com solventes não-aquosos (KUMAR et al., 2011, LI e ZONG, 2010). Essas enzimas apresentam grande potencial biotecnológico devido, principalmente, a algumas características, tais como: podem ser estáveis em solvente orgânico; não necessitarem, em sua maioria, de cofatores; possuírem diversificada especificidade por substrato; poderem apresentar elevada regio e/ou enantio seletividade (JAEGER, REETZ, 1998).

Em sua maioria, as lipases são caracterizadas pela sua atuação na interface orgânico-aquosa, e esse fenômeno interfacial é umas das características que as distinguem das esterases, que obedecem a cinética de Michaelis-Menten, apresentando atividade cinética normal em solução contendo substratos solúveis, enquanto as lipases precisam de uma concentração mínima de substrato para apresentarem elevada atividade (JAEGER, REETZ, 1998). Enquanto as lipases possuem maior atividade em substratos insolúveis, comumente os triglicerídeos de cadeia longa, com mais de dez átomos de

carbono, as esterases hidrolisam apenas triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeias menores, com até seis átomos de carbono, e ésteres simples, tais como acetato de etila (BORNSCHEUER, 2002; SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001).

Plantas, animais e micro-organismos são produtores naturais de lipases. No entanto, as de origem microbiana são as mais empregadas comercialmente, principalmente as de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, uma vez que estes apresentam menor tempo de geração, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação genética de sua capacidade produtiva e das condições de cultivo (CONTESINI et al., 2010; LI, ZONG, 2010). Nas plantas, as lipases estão presentes em tecidos de reserva de energia de uma grande variedade de espécies, além de plantas superiores como a mamona (*Ricinus communis*) e canola (*Brassica napus*) (SHARMA, CHISTI, BANERJEE, 2001). Já nos animais, as lipases são encontradas no pâncreas e, desde sua descoberta em 1856 por Claude Bernard, são as mais conhecidas e investigadas. Porém, devido à dificuldade de coleta e escassez de pâncreas, os estudos para produção destas enzimas por micro-organismos intensificaram-se (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

Uma vez que os micro-organismos apresentam multiplicidade de *habitats*, estes produzem diferentes lipases e, dependendo do micro-organismo produtor, estas podem apresentar características distintas, tais como: especificidade posicional e ao substrato, faixas ótimas de pH e temperatura (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006). Os fungos filamentosos são reconhecidos pela sua elevada capacidade de produção de lipases, que sendo extracelulares facilitam o processo de recuperação (CONTESINI et al., 2010). A maioria das espécies produtoras pertencem ao gênero *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*

O mercado mundial de enzimas industriais movimenta cerca de 4 bilhões de dólares por ano, e a estimativa no Brasil é de aproximadamente cerca de 240 milhões de dólares, ou apenas 6% do mercado global (ABIAM, 2015). Devido sua diversidade nas propriedades enzimáticas e especificade ao substrato, as lipases são muito atrativas para aplicações industriais, sendo usadas de duas formas: como catalisadores biológicos para fabricar outros produtos (tais como ingredientes de alimentos), ou sua aplicação direta (industrias de detergentes) (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006; JAEGER, EGGERT, 2002). As lipases podem ser empregadas na obtenção de diversos produtos, tais como:

- Novos materiais poliméricos - lipases e esterases são usadas como catalisadores para síntese de polímeros, apresentando vantagem de possuir elevada seletividade (estereoseletividade, quimioseletividade e regioseletividade) quando sob condições ótimas do meio reacional. Estas tornaram-se um dos grupos mais importantes de enzimas para aplicações em síntese orgânica;
- Biodiesel – combustível produzido quimicamente usando óleos derivados de uma grande variedades de plantas. Usando lipases e solventes orgânicos, metanol ou etanol por exemplo, estas são catalisadoras da transesterificação dos óleos vegetais em ésteres metilicos ou etílicos de ácidos graxos;
- Produtos da chamada química fina - são intermediários essenciais para síntese de produtos terapeuticos, agroquímicos e compostos aromáticos, uma vez que esses são complexos e/ou quirais, sendo difícil sua síntese por via química;
- Detergentes - é um dos maiores campos de aplicação dessas enzimas. As lipases são adicionadas aos detergentes a fim de aumentar sua ação de detergência.

Sua aplicação no tratamento de resíduos e efluentes domésticos e indústriais, e também no tratamento das escumas geradas nos reatores aeróbios e anaeróbios, vem sendo estudada e empregada, uma vez que estas enzimas atuam na hidrólise dos O&G presentes no efluente, prevenindo assim os problemas operacionais gerados por estes. Exemplos de sua aplicação são: na degradação de resíduos orgânicos complexos, onde uma mistura comercial de lipases, celulases, proteases e amilases são empregadas; e no tratamento de esgotos nas limpezas de tanques sépticos, caixas de gordura, entre outros (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006; JAEGER, EGGERT, 2002).

A maioria das enzimas industriais comercializadas são produzidas em larga escala por fermentação submersa em cultivos em batelada ou batelada alimentada. Entretanto, a utilização da fermentação em estado sólido é uma alternativa para sua produção, com a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, tornando o processo viável economicamente do ponto de vista de sua aplicação em tratamento de efluentes (PANDEY, 2003).

Fermentação no Estado Sólido (FES) é uma tecnologia de fermentação envolvendo o crescimento dos micro-organismos em matrizes sólidas com ausência (ou quantidade limitada) de água livre visível. A água presente nesses sistemas encontra-se

absorvida à fase sólida, encontrando-se no interior da partícula e na superfície, formando uma fina camada (PINTO et al., 2005; PANDEY, 2003). Também denominada Fermentação Semissólida (FSS), foi uma técnica muito usada antigamente e, com o advento das novas tecnologias empregando micro-organismos e utilizando resíduos gerados por atividades antrópicas, observou-se que a FES oferece inúmeras vantagens para a produção de bioprodutos (PANDEY, 2003; SCHMIDELL et al., 2001).

Nos países orientais, asiáticos e africanos, desde os tempos antigos os processos de FES têm sido extensivamente empregados para a produção de alimentos fermentados, tais como o *shoyo*, que é produzido a partir de soja e trigo fermentado pelo fungo *Aspergillus oryzae*; o *sake*, produzido através da sacarificação do arroz e *angkak*, arroz vermelho produzido pelo crescimento do *Monascus pupurea* (MITCHEL et al., 2002). No ocidente, essa tecnologia foi introduzida por volta de 1890, quando o japonês Takamine fundou, nos Estados Unidos, uma fábrica de enzimas baseada nesta tecnologia onde realizou a produção de “moldbran” que visava substituir o malte na indústria de destilados (PASTORE, BICAS, JÚNIOR, 2013; SATO, SUDO, 1999).

Segundo Pandey (2003), as pesquisas e desenvolvimentos dos processos de FES foram praticamente negligenciados após 1940, sendo toda a atenção do ocidente voltada para os processos de Fermentação Submersa (FS). Em virtude da produção do antibiótico penicilina ter sido desenvolvida através de FS, e este produto foi muito utilizado durante a Segunda Guerra Mundial. Essa tecnologia tornou-se um modelo para produção de qualquer composto produzido por fermentação. Portanto, durante vários anos o ocidente expandiu o desenvolvimento de equipamentos e tecnologias de monitoramento e controle da FS. Poucos foram os estudos desenvolvidos para FES durante este período.

Somente a partir do enriquecimento protéico de ração animal pela técnica da FES é que esta tecnologia começou a atrair a atenção de vários grupos de pesquisa pelo mundo. Especialmente devido a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais de baixo custo como matéria-prima para a fermentação, a produção de produtos de interesse biotecnológico a partir da FES vem sendo extensivamente estudada nas últimas décadas pois, em um único processo, ocorre adição de valor e destinação ambientalmente adequada destes resíduos. Sendo assim, inúmeras novas aplicações vem

sendo desenvolvidas para FES, várias são as patentes, biorreatores e produtos microbianos aplicados para alimentos, ração, além de metabólitos primários e secundários (PANDEY, 2003; SCHMIDELL et al., 2001; RIGO et al., 2012).

Muitos aspectos devem ser considerados para o desenvolvimento do processo de FES, entre eles a escolha da matéria-prima e micro-organismo a ser empregado. Uma vez que esse processo ocorre na ausência ou quase ausência de água livre fungos e leveduras são geralmente os mais utilizados, já que estes apresentam capacidade de crescer em meios com baixa atividade de água. Porém, atividade de água não é uma restrição para aplicação de bactérias, haja visto que vários pesquisadores vêm empregando, com sucesso, este micro-organismo (PANDEY, 2003; SCHMIDELL et al., 2001).

As matérias-primas usadas para FES são geralmente resíduos agroindustriais que se assemelham quanto à insolubilidade em água, porém diferem grandemente em relação a sua composição química e natureza. Esta natureza heterogênea da matéria-prima é um problema para os estudos cinéticos e de modelagem do processo, sendo essas informações extremamente importantes para o desenvolvimento de projeto dos biorreatores e sua operação. Um aspecto que necessita de atenção especial é quanto à transferência de calor e massa na FES, devido à baixa condutividade dos substratos sólidos e a reduzida quantidade de água. Gradientes de temperatura, umidade, substrato e produto são frequentemente formados em FES (PANDEY, 2003; SCHMIDELL et al., 2001; THOMAS, LARROCHE, PANDEY, 2013).

Um estudo da quantidade de água utilizada no processo também é de importância fundamental, devido ao seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida, pois ela está relacionada intrinsecamente a dois parâmetros: umidade e atividade de água (a_w). A umidade diz respeito à porcentagem de água total disponível no meio, já a atividade de água é um parâmetro termodinâmico ligado ao potencial químico da água, ou seja, à quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato. Para melhor entendimento da interação entre o substrato, micro-organismo e água disponível para as reações metabólicas, a atividade de água é o melhor parâmetro de controle por afetar diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos (PASTORE, BICAS, JUNIOR, 2013).

O Laboratorio de Biotecnologia Microbiana (Labim) da UFRJ vem estudando a produção de lipases por FES empregando fungos filamentosos, tais como *Penicillium simplicissimum* (DUARTE, 2013), *Rhizomucor miehei* (SILVA, 2014) e *P. restrictum* (LEAL et al., 2006). Os estudos desse grupo de pesquisa demonstram que fungos filamentosos são capazes de crescer utilizando como meio basal resíduos agroindustriais como a torta de babaçu (GOMBERT et al., 1999), rejeito de mamona (GODOY et al., 2011), torta de soja (VARGAS et al., 2008) e pinhão manso (GODOY, 2009). Sethi et al. (2013) empregou o fungo *Aspergillus terreus* utilizando como meio basal resíduo da prensagem do óleo de mostarda para produção de lipases, assim como o fungo *A. fumigatus* foi testado para produção de lipases utilizando o resíduo de soja como substrato por Reinehr et al. (2014).

Atualmente, inúmeros trabalhos estão sendo desenvolvidos na área de FES, como o enriquecimento proteico de resíduos agroindustriais, nos quais o teor proteico aumenta devido ao crescimento dos micro-organismos, sendo empregados para ração humana e animal; a destoxificação de resíduos por meio da eliminação de substâncias recalcitrantes e/ou tóxicas que impedem sua aplicação; e a produção de compostos de alto valor agregado, como enzimas e diferentes metabólitos (PINTO et al., 2005; PANDEY, 2003). Aplicações industriais desta tecnologia estão em diversos setores, tais como: combustíveis, alimentos, químico e farmacêutico, obtendo-se como bioprodutos: enzimas, biopolímeros, biosurfactantes, ácidos orgânicos, pigmentos, além de compostos bioativos, biofertilizantes, biopesticidas, compostos flavorizantes (THOMAS et al., 2013).

2.6 APLICAÇÃO DE LIPASES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE O&G

Quando em concentração elevada, os óleos e graxas podem ser considerados contaminantes orgânicos uma vez que geram problemas operacionais dentro de ETE. Lipases produzidas pelos micro-organismos podem desempenhar um papel essencial no processo de tratamento de efluentes domésticos em virtude de atuarem seletivamente

sobre esse composto (FACCHIN, 2013). Sendo assim, a utilização destas enzimas tem despertado grande interesse em muitos grupos de pesquisa no mundo, e o desenvolvimento de processos como alternativa ao tratamento convencional de efluentes vêm gerando bons resultados (SANTOS, 2014; ROMAN, BURGESS, PLETSCHKE, 2006; TAKENO, YAMAOKA, SASAKI, 2005).

As lipases são utilizadas em ETE para: hidrólise dos resíduos produzidos nas etapas de tratamento que apresentam elevadas concentrações de O&G; prevenção ou limpeza de caixas de gorduras ou tubulações ou como forma de pré-tratamento do próprio efluente doméstico (JAEGER, EGGER, 2002). Como já mencionado no item 2.4, o consumo de O&G pela população tende a aumentar, com consequente aumento da presença deste no esgoto doméstico. Portanto, técnicas de remoção e tratamento deste composto vêm sendo desenvolvidas para minimizar seus efeitos, tanto sobre os sistemas de tratamento quanto sobre os corpos hídricos nos quais os efluentes domésticos são despejados (BHUMIBHAMON, PHATTAYAKORN, 2003; CHEN et al., 2009; NISOLA et al., 2009; SANGALETTI-GERHARD et al., 2015; SANTOS, 2014; TAKENO, YAMAOKA, SASAKI, 2005; TZIRITA, 2012).

Uma das principais preocupações ao se empregar enzimas para tratamento de esgoto é seu custo. Inúmeras bactérias produtoras de enzimas hidrolíticas estão presentes no esgoto doméstico, e o isolamento das cepas, estudo cinético das lipases produzidas e da hidrólise do esgoto é uma forma de reduzir os custos dessa tecnologia. Ademais, a adaptabilidade da enzima aos O&G presentes no esgoto e seu emprego, na maioria das vezes, sem necessidade de purificação reduzem ainda mais o custo (FACCHIN, 2013; TAKENO, YAMAOKA, SASAKI, 2005).

Pensando nisso, Facchin (2013) isolou as bactérias presentes no esgoto doméstico com o objetivo de avaliar o potencial destas em produzir lipases e, através do método qualitativo utilizando tributirina como substrato, encontrou 35 cepas com potencial positivo de produção. Com o intuito de avaliar se essas enzimas podem ser empregadas em ETE a autora realizou sua caracterização em relação a estabilidade térmica e na presença de agentes químicos, assim como tolerância a variações de pH. A maioria das lipases secretadas pelas bactérias isoladas apresentaram estabilidade térmica, mantendo atividade residual de 70% após tratamento térmico de 30 minutos a 50°C, somente as enzimas produzidas por espécies do gênero *Bacillus* é que

apresentaram baixa atividade a essa temperatura, com exceção das secretadas por isolados de *B. cereus*. O pH ótimo para a maioria das enzimas foi básico, variando de 6,8 a 12,3, com exceção das do gênero *Lysinibacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e família Enterobacteriaceae que variaram de 4,3 a 6,8. Como há presença de detergente e outros compostos químicos no esgoto, a estabilidade na presença de H_2O_2, NaClO, detergentes líquidos e EDTA foi analisada, somente as cepas da ordem Saccharomycetales apresentaram atividade residual acima de 90% para as quatro condições impostas conjuntamente. A autora afirma a importância da escolha de enzimas que apresentam estabilidade a esses compostos, principalmente detergentes e sabões, que são despejados diariamente e em grandes quantidades nos esgotos. Das 35 cepas analisadas aproximadamente 45% são resistentes a 0,25% (v/v) de H_2O_2, 20% são resistentes a 0,1% (v/v) de NaClO ou 10 mM de EDTA e mais de 50% são resistentes a 0,1% (v/v) de detergente líquidos. Apesar de ter feito a caracterização das lipases para aplicação no tratamento de esgotos a etapa de aplicação destas enzimas não foi abordado no estudo, sugerindo assim que outros trabalhos sejam produzidos utilizando essas lipases caracterizadas para hidrólise dos O&G presentes no esgoto.

A aplicação de lipases para tratamento de escumas geradas em reatores UASB foi estudada por Santos (2014). Utilizando duas enzimas comerciais (Lipolase 100L e papaína bruta) a autora avaliou o efeito destas sobre a biodegradabilidade anaeróbia das escumas. As condições de biodegradabilidade aneróbia empregadas neste trabalho foi de 30°C e pH 7, e a atividade lipásica foi medida nestas condições para ambas as enzimas, que obteram atividade de 120 U/mL e 43 U/mL para Lipolase 100L e papaína bruta, respectivamente. Testes preliminares de hidrólise do material foram realizados com diferentes concentrações de ambas as enzimas e, ao final do experimento, a concentração de 1% (m/v) obteve maior produção de ácidos livres, 180 µmoles/mL com Lipolase 100L e 220 µmoles/mL com papaína bruta. Partindo deste resultado, testes de biodegradabilidade da escuma com 1% (m/v) de enzima, foram realizados. Comparado a um reator controle (escuma e lodo), a adição de 1% da papaína bruta aumentou a produção de metano de 504 mL (no controle) para 950 mL, indicando um incremento de 68% na produção de metano. A autora também obteve maior remoção de DQO 79% e O&G 80%, em comparação ao controle que apresentou remoções de 61% e 53%, respectivamente.

Takeno, Yamaoka e Sasaki (2005) avaliaram um tratamento para remoção do óleo de cozinha de esgoto doméstico utilizando duas bactérias (*Rhodobacter shaeroide* S e *R. shaeroides* NR-3) imobilizadas em alginato de sódio (2%) ou ágar (2%). Um tratamento aeróbio em batelada, empregando as cepas imobilizadas (100 g), da mistura de efluente sintético de esgoto e óleo de cozinha com concentração de 3300 mg/L de O&G foi estudado durante 6 dias a 30°C, e resultados mostraram que a remoção deste composto foi de 74,2, 58,2 e 15,8% com imobilização em alginato da *Rhodobacter shaeroide*S, *R. shaeroides* NR-3 e controle, respectivamente. Para avaliar o acúmulo dos AGV no sistema o efluente sintético com concentração de 5000 mg/L de O&G foi utilizado, empregando a *Rhodobacter shaeroide*S imobilizada em alginato (10 g) sob condições aeróbias. Os autores encontraram concentrações de ácido acético e proprionico finais de 23,8 e <0,1 mg/L, respectivamente nos reatores tratados com as células imobilizadas, enquanto que no controle as concentrações destes compostos foi de 136 e 586 mg/L, respectivamente, mostrando assim o acúmulo destes compostos nos efluentes com elevada concentração de O&G. Outro experimento foi realizado onde os autores avaliaram o tratamento contínuo deste efluente com a bactéria *R. shaeroide*S imobilizada em alginato, fixando uma taxa de diluição de 0,4/dia e concentração de O&G de 10000 mg/L. Estes resultados indicam que 96% dos O&G foram removidos do efluente tratados com a bactéria imobilizada e a taxa máxima de remoção alcançada foi de aproximadamente 3,83 kg óleo /m³/dia.

O emprego de micro-organismos produtores de lipases diretamente no processo também foi estudado por Nisola et al. (2009) para degradar os óleos e graxas de efluentes oriundos de cozinha. *Pseudomonas aeruginosa* D2D3 são reportadas na literatura como boas produtoras de lipases, e os autores realizaram experimentos, em escala de laboratorio, utilizando essas bactérias imobilizadas em três suportes (farelo de arroz, poliuretano e cerâmica) para tratar o efluente sintético de restaurante com diferentes concentrações de O&G (200 a 10000 mg/L), sendo avaliados as eficiências de remoção de DQO e O&G. Empregando testes estatísticos para avaliar a diferença significativa entre o tratamento com o micro-organismos e um controle, somente para concentrações acima de 5000 mg/L de O&G é que este tratamento apresentou diferença significativa obtendo elevada performance ($p = 0,0006$ e 0,0058 para concentrações de O&G de 5000 e 10000 mg/L, respectivamente). Em relação a eficiência de remoção de DQO, esta foi mais alta na concentração de 10000 mg/L (91,7% ± 1,53%) quando

comparada ao controle (85,3% ± 0,58%), no qual foi encontrada diferença significativa (p=0,03).

Algumas empresas no Brasil dispõem de tratamento dos O&G nos esgotos domésticos a partir de enzimas e/ou micro-organismos. A empresa GHS dispõe de tecnologia para tratamento dos resíduos presentes nas caixas de gordura. A empresa utiliza dois produtos, um composto sólido de bactérias e enzimas e um líquido somente com enzimas, para tratar caixas de gordura e estações de tratamento de efluentes. Outro produto disponível no mercado brasileiro é o Enzilimp, este produto é constituído de cepas liofilizadas de micro-organismos que por ação de suas enzimas, principalmente lipases, hidrolisam as gorduras presentes no esgotos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Produtos químicos

Os principais produtos químicos utilizados neste trabalho, assim como seus respectivos fornecedores, encontram-se listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados nos experimentos

Produto	Fornecedor
Acetona	Vetec, Sigma-Aldrich
Ágar Batata Dextrose (PDA)	Himedia
Azida sódica	Vetec
Etanol	Vetec, Sigma-Aldrich
Fosfato de potássio dibásico	Vetec
Fosfato de potássio monobásico	Vetec
Goma Arábica	Vetec
Hexano	Vetec
Hidróxido de sódio	Vetec
p-nitrofenil ester	Sigma
Terra de infusórios	Vetec
Tween 80	Riedel-de-Haen

3.1.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Principais equipamentos utilizados nos experimentos

Equipamento	Fabricante
Balança analítica	Bioscale
Balança de umidade MOC 63u	Shimadzu
Banho com agitação	Nova Ética
Banho de recirculação	Corola
Bateria de Placas de aquecimento	Quimis
Câmara de fluxo laminar	Elzividros
Centrífuga	Fanem
Cromatógrafo micro GC 4900	Varian
Espectrofotômetro UV/VIS	Shimadzu
Espectrofotômetro	Hach
Estufa com circulação de ar	Fanem
Microscópio óptico	Zeiss
Moinho de facas	Solab científica
Placas de agitação	Corning
Potenciômetro	Sensoglass
Shaker	Thermo Scientific 420

3.2 MÉTODOS

O diagrama descrito na Figura 3.1 representa um esquema simplificado das etapas realizadas nesta pesquisa.

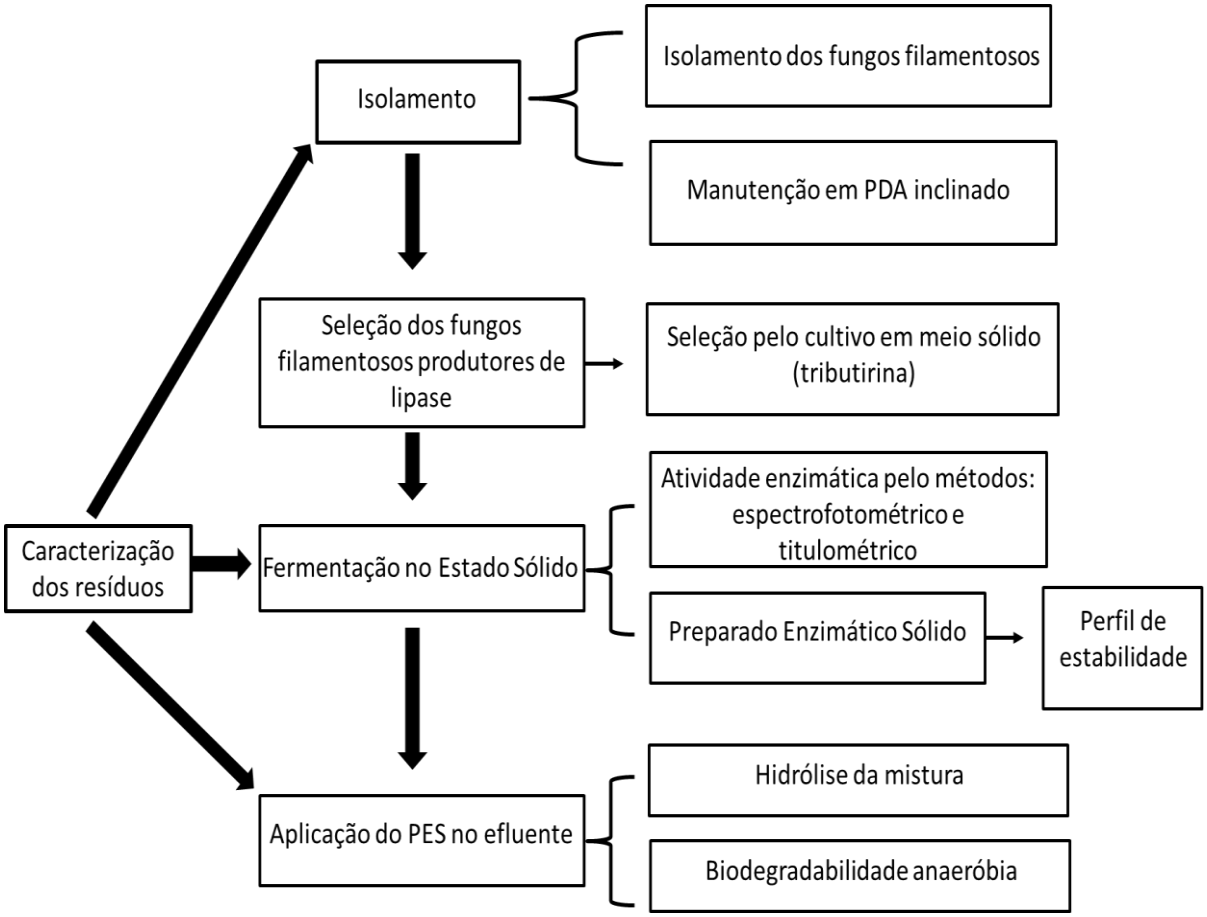


Figura 3.1 – Etapas da pesquisa.

3.2.1 Métodos analíticos

3.2.1.1 Extração das Enzimas

Alíquotas da torta fermentada foram retiradas durante a FES para posterior avaliação e monitoramento da produção de lipase (umidade, pH e extração das

enzimas). Ao final da fermentação foram adicionados 5 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0) por grama de torta inicial. A extração do preparado enzimático foi realizada em agitador rotatório a 30°C e 200 rpm por 20 minutos. Posteriormente, a torta foi prensada manualmente para obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a uma força centrífuga relativa (FCR) de 700g por 5 min para remoção dos sólidos mais finos (GOMBERT et al., 1999). Para medida do pH das amostras, 1 g do material fermentado foi suspenso em 5 mL de água destilada. A mistura foi vigorosamente agitada e, após 3 minutos, o pH do sobrenadante foi medido em potenciômetro.

3.2.1.2 Quantificação da atividade lipásica por Método Titulométrico

A atividade lipásica foi determinada por método titulométrico utilizando como substrato óleo de oliva (5% m/v) da marca Borges emulsionado por 3 min com goma arábica (5% m/v) em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0). O extrato enzimático (1mL) foi adicionado a 19 mL de emulsão e incubado por 15 minutos a 35°C em banho de agitação a 200 rpm. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de acetona:etanol (1:1 v/v), que também promove a extração dos ácidos graxos liberados. Os ácidos graxos foram titulados com solução de NaOH 0,04 N até pH final 11,0. Os brancos reacionais foram obtidos adicionando-se o preparado enzimático após solução de acetona:etanol. Uma unidade de atividade lipásica é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo livre por minuto nas condições do ensaio (FREIRE et al., 1997). O cálculo da atividade enzimática está descrito na Equação 3.1 a seguir:

$$A = \frac{(V - V_b).M.1000.V_{ext}}{t.V_a.m_i} \qquad (3.1)$$

Onde:

A= Atividade lipásica (U/g)

V = Volume de solução de NaOH gasto para titulação da amostra (mL)

V_b = Volume de solução de NaOH gasto para a titulação do branco (mL)

M = Molaridade da solução de NaOH (milimoles/mL)

t = Tempo de reação (min)

V_a = Volume da amostra (mL)

Vext = Volume de extração enzimática (mL)

m_i = Massa seca inicial da torta (g)

3.2.1.3 Quantificação de atividade lipásica por Método Espectrofotométrico

A atividade lipásica também foi determinada pelo método espectrofotométrico, que se baseia na formação de um produto cromóforo (p-nitrofenol) a partir da reação de hidrólise do p-nitrofenil laurato catalisada por lipases. A solução do substrato foi preparada utilizando-se 0,25 mL de *p*-nitrofenil laurato 2,5 mM em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato enzimático e conduzida a 30°C. A formação do *p*-nitrofenol foi acompanhada em espectrofotômetro a 412 nm. Uma unidade de atividade lipásica é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de p-nitrofenil laurato por minuto nas condições do ensaio (FREIRE et al., 1997).

$$A = \frac{(\alpha.F.V_f).V_{ext}}{V_a.m_i}.F_d \qquad (3.2)$$

Onde:

A= Atividade lipásica (U/g)

α = Coeficiente angular da reta (Abs x tempo)

V_f = Volume final (mL)

F = Fator (Abs x concentração de produto)

F_d = Fator de diluição

V_a = Volume da amostra (mL)

Vext = Volume de extração enzimática (mL)

m_i = Massa seca inicial da torta (g)

3.2.1.4 Umidade

A umidade em todas as amostras foi determinada em balança determinadora de umidade modelo MOC-63U da marca SHIMADZU.

3.2.1.5 pH

O pH de todas as amostras foi medido por leitura direta em potenciômetro da marca Sensoglass, modelo SP 1800, calibrado com soluções tampão pH 4 e 7.

3.2.1.6 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO foi medida pelo método padrão colorimétrico de refluxo fechado, com $K_2Cr_2O_7$ em meio ácido, contendo Ag_2SO_4 como catalisador e $HgSO_4$ para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra. As amostras foram digeridas a 150°C durante 2 horas. Após resfriamento, a absorbância foi lida a 600 nm em espectrofotômetro Hach DR 2000. Para DQO solúvel o mesmo procedimento é empregado, com diferença no preparo da amostra, que antes da adição das soluções reagentes, é filtrada em membranas de 0,45μm. As análises foram realizadas em triplicata e o branco reacional foi preparado pela adição de água em substituição à amostra. Uma curva padrão foi preparada previamente empregando-se biftalato de potássio como substância padrão, sendo utilizada para converter a absorbância (600nm) das amostras em DQO (APHA, 2005).

A eficiência de remoção de DQO nos testes de biodegradabilidade anaeróbia foi calculada de acordo com a Equação 3.3.

$$\%DQO\ remov. = \frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i} . 1000 \qquad (3.3)$$

Onde:

% DQO remov.= Porcentagem de DQO removida

DQO_i = DQO inicial da amostra

DQO_f = DQO final da amostra

3.2.1.7 Óleos e Graxas (O&G)

O teor de óleos e graxas nas amostras foi determinado por extração em Soxhlet utilizando hexano como solvente, de acordo com metodologia padrão (APHA, 2005). Inicialmente, para preservação da amostra, quebra da emulsão e facilidade de separação do óleo as amostras foram acidificadas com HCl 1:1 (v/v). Em seguida, filtradas à vácuo em funil Buchner contendo um filtro de tecido de algodão, papel de filtro Whatman nº 4 e suspensão auxiliar de terra diatomácea 5% (m/v). O filtro, com o material oleoso retido, foi dobrado e introduzido no cartucho de extração previamente limpo com hexano, e levado para secagem em estufa a 105°C por 30 minutos. Após secagem, o cartucho é introduzido no extrator, sendo este conectado a um balão de vidro contendo hexano, cuja tara é conhecida. A extração ocorre pela evaporação do solvente a uma velocidade de 20 ciclos por hora, durante 4 horas. Finalizada a extração, o solvente é evaporado em rotoevaporador e o balão de destilação, contendo as gorduras extraídas, é seco em estufa a 70ºC, resfriado em dessecador e pesado. A concentração de óleos e graxas presentes na amostra é calculada de acordo com a Equação 3.4.

$$\frac{mg}{L}\,\text{óleo ou graxa} = \frac{(P_2 - P_1).10^6}{V} \qquad (3.4)$$

Onde:

P_1 = Peso em g do balão vazio

P_2 = Peso em g do balão + resíduo

V = Volume da amostra (mL)

Para amostras sólidas somente a etapa de filtração não foi realizada, sendo a amostra colocada em um papel de filtro e introduzida diretamente no cartucho para extração. A equação (3.5) para o cálculo da concentração de O&G neste tipo de amostra está descrita a seguir.

$$\frac{mg}{g}\,\text{óleo ou graxa} = \frac{(P_2 - P_1).10^3}{m} \qquad (3.5)$$

Onde:

P_1 = Peso do balão vazio (g)

P_2 = Peso do balão + resíduo (g)

m = Massa da amostra (g)

3.2.1.8 Sólidos Totais, Fixos e Voláteis (ST, SFT e SVT)

Para determinação dos sólidos totais, fixos e voláteis das amostras, cápsulas de porcelana foram previamente taradas em mufla a 550ºC durante 30 minutos, esfriadas em dessecador e pesadas, sendo este peso denominado P_1. Um volume de 20mL de amostra foi adicionado à cápsula e seco em estufa por 105ºC até peso constante, este peso é referente ao P_2. A cápsula foi, então, novamente levada à mufla a 550ºC por 30 minutos, esfriada em dessecador e seu peso identificado como P_3. As concentrações de sólidos totais (ST), fixos (SFT) e voláteis (SVT) foram calculadas através das Equações 3.6 a 3.8 (CETESB, 1999).

$$ST = \frac{(P_2 - P_1).10^6}{V} \quad (3.6)$$

$$SFT = \frac{(P_3 - P_1).10^6}{V} \quad (3.7)$$

$$SVT = \frac{(P_2 - P_3).10^6}{V} \quad (3.8)$$

Onde:

P_1 = Peso da cápsula vazia (g)

P_2 = Peso da cápsula + resíduo após estufa a 105°C (g)

P_3 = Peso da cápsula + resíduo após mufla (g)

V = Volume da amostra (mL)

ST = Sólidos Totais (mg/L)

SFT = Sólidos Fixos Totais (mg/L)

SVT = Sólidos Voláteis Totais (mg/L)

3.2.1.9 Sólidos em Suspensão Totais, Fixos e Voláteis (SST, SSF e SSV)

Para determinação dos sólidos em suspensão totais, fixos e voláteis das amostras, cápsulas de porcelana contendo membrana de fibra de vidro foram previamente taradas em mufla a 550°C por 30 minutos, esfriadas em dessecador e pesadas, sendo este peso denominado $P_{1.}$ Um volume de 20 mL de amostra foi filtrado, através de sistema à vácuo, e o conjunto membrana e cadinho seco em estufa por 105°C até peso constante, este peso é denominado P_2. Em seguida, a cápsula e o filtro foram levados novamente à mufla a 550ºC por 30 minutos, esfriados em dessecador e seu peso identificado como P_3. As concentrações de sólidos suspensos totais (SST), fixos (SSF) e voláteis (SSV) foram calculadas através das Equações 3.9 a 3.11 (CETESB, 1999).

$$SST = \frac{(P_2 - P_1).10^6}{V} \qquad (3.9)$$

$$SSF = \frac{(P_3 - P_1).10^6}{V} \qquad (3.10)$$

$$SSV = \frac{(P_2 - P_3).10^6}{V} \qquad (3.11)$$

Onde:

P_1 = Peso da cápsula vazia + membrana de fibra de vidro (g)

P_2 = Peso da cápsula + membrana + resíduo após estufa a 105°C (g)

P_3 = Peso da cápsula + resíduo após mufla (g)

V = Volume da amostra (mL)

SST = Sólidos Suspensos Totais (mg/L)

SSF = Sólidos Suspensos Fixos (mg/L)

SSV = Sólidos Suspensos Voláteis (mg/L)

3.2.1.10 Medição e análise da composição de biogás

O volume do biogás produzido nos testes conduzidos em frascos tipo penicilina de 100 mL, com 10 % de "*headspace*", foi medido pelo deslocamento do êmbolo de

seringas de 60 mL, conectadas aos frascos. O biogás produzido foi injetado diretamente em cromatógrafo VARIAN MICRO GC 4900 para determinação da sua composição e percentual de metano. As condições utilizadas na cromatografia foram (DUARTE, 2013): Coluna – PPQ – 10 m x 0,32 mm; Temperatura da coluna – 50°C; Detector – Condutividade térmica (TCD); Temperatura do detector – 250°C; Temperatura do injetor – 80°C; Gás de arraste – Hélio; Tempo de análise – 1 minuto.

3.2.1.11 Determinação do Teor de Ácidos Livres

A determinação do teor de ácidos livres foi realizada através da titulação de 10 mL da amostra. A estas alíquotas foram adicionados 10 mL da solução de acetona:etanol (1:1) a fim de paralisar o processo de hidrólise. O teor de ácidos liberados foi determinado por titulação manual até pH 11,0 com solução padronizada de NaOH 0,04 mol/L. Os brancos reacionais foram obtidos através do monitoramento, sob as mesmas condições de reação, porém sem a adição de PES. A Equação 3.12 foi utilizada para calcular a concentração de ácidos livres (DUARTE, 2013).

$$AL = \frac{V.N.1000}{V_{am}} \quad (3.12)$$

Onde:

AL= Teor de ácidos livres (µmoles/mL)

V = Volume de NaOH titulado (mL)

V_{am} = Volume da amostra (mL)

N = Normalidade da solução de NaOH

3.2.1.12 Determinação de Alcalinidade Total

Cinquenta mL da amostra bruta foram transferidos para um béquer de 100 mL, e o pH inicial medido. A titulação da amostra foi feita, sob agitação magnética, através da adição de solução padronizada de H_2SO_4 (0,1N) até pH 5,75, sendo o volume de ácido gasto até este valor anotado e denominado V_1. Essa alcalinidade é denominada parcial,

podendo aproximar-se à alcalinidade a bicarbonato, uma vez que compreende 80% de bicarbonato e 20% de sais de ácidos orgânicos voláteis. A titulação continuou até pH 4,3, e o volume da solução titulante foi anotado e denominado V_2. A alcalinidade total é a soma dos dois volumes de H_2SO_4 encontrados ($V_1 + V_2$), e seu cálculo está descrito na Equação 3.13 (APHA, 1999):

$$A_{total} = \frac{V_3.N.50.000}{V_{am}} \qquad (3.13)$$

Onde:

A_{total} = Alcalinidade Total (mg/L, como $CaCO_3$)

50.000 = é o equivalente-grama do $CaCO_3$ em mg/L, cujo mol é 100 g

N = Normalidade do H_2SO_4

V_{am} = Volume da amostra (mL)

V_3 = São os volumes V_1 e V_2 em mL.

3.2.1.13 Determinação de Ácidos Voláteis

Utilizou-se a amostra titulada na análise de alcalinidade total. O pH de 4,3 foi reduzido para 3,3 com H_2SO_4, essa redução é para eliminação dos íons bicarbonatos. Após essa redução a amostra foi aquecida até temperatura de ebulição, com auxílio de chapa de aquecimento, por 3 minutos. Este procedimento foi feito para remoção do ácido carbônico da solução.

Resfriou-se até temperatura ambiente, e a amostra foi então corrigida para pH 4 com solução de NaOH (0,1N), sendo este volume desprezado. Uma nova titulação foi feita com a mesma solução titulante até pH 7. A concentração de ácidos voláteis presentes na amostra foi calculada pelas equações 3.14 e 3.15 (APHA, 1999).

$$A_{ácidos\ voláteis} = \frac{V.N.60.000}{V_{am}} \qquad (3.14)$$

Onde:

$A_{ácidos\ voláteis}$ = Ácidos Voláteis (mg/L, como HAc)

V = Volume de NaOH gasto de pH 4 para 7

60.000 = é o equivalente-grama do HAc (ácido acético), em mg

N = Normalidade da solução de NaOH

V_{am} = Volume de amostra (50 mL)

Para concentrações de HAc em mg/L > 216 mg/L:

$$A_{ácidos\ voláteis} = A_{ácidos\ voláteis}\ x\ 1{,}5 \qquad (3.15)$$

3.2.1.14 Determinação de Carboidratos Solúveis

Foi adicionado 0,05 mL de uma solução fenol 80% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado em um volume de 2 mL da amostra filtrada. Os tubos de ensaio, contendo as amostras, foram deixados em repouso por 10 minutos, e agitados por 10 minutos em vórtex. Em seguida, levados para banho de água a 30°C por 15 minutos. A absorbância foi lida a 488 nm e convertida em equivalente-glicose por meio de curva-padrão em espectrofotômetro. Um branco foi feito pela substituição da amostra por água destilada (DUBOIS et al., 1956).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DO RESÍDUO DA ETE

Nesta primeira etapa do trabalho, foi feito um levantamento dos fungos filamentosos presentes no resíduo proveniente do decantador primário de uma Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) localizada no Rio de Janeiro.

O isolamento dos fungos filamentosos foi realizado através de plaqueamento em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (PDA) com pH final de 5,6. Esta técnica consistiu em passar uma alça de inoculação no resíduo e, através de estriamento, espalhá-lo na superfície do meio de cultura solidificado em placas de Petri. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 28°C por 5 dias. As colônias foram repicadas várias vezes até se obter o isolamento de cada cepa.

Os esporos das colônias distintas foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio PDA inclinado e mantidos sob refrigeração para os testes de atividade lipolítica. Para preservação das cepas foi utilizado o método de repique contínuo, que se caracteriza pela transferência dos esporos da cultura de um fungo para tubos de ensaio contendo meio PDA inclinado, que são incubados em estufa a 28°C por 7 dias. Após seu crescimento, estas cepas são mantidas sob refrigeração (4°C) fazendo-se repiques trimestrais (GUIMARÃES, 2011).

Os fungos filamentosos constituem um grupo de micro-organismos de grande interesse prático e científico sendo encontrados em todos os ambientes, tais como água, solo e ar (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997). Seu isolamento do resíduo da ETE objetivou encontrar espécies produtoras de lipases adaptadas ao resíduo a ser utilizado como meio basal para a Fermentação no Estado Sólido (FES).

Um aspecto importante para o desenvolvimento da FES é a seleção de micro-organismos adequados para o substrato a ser empregado. Dentre os diferentes tipos de micro-organismos que podem se desenvolver sobre os substratos sólidos os fungos

filamentosos são os mais empregados, pois são capazes de crescer em baixos níveis de umidade, além de apresentarem características morfológicas favoráveis, devido seu crescimento ocorrer por meio de hifas, a qual favorece a colonização do meio (PANDEY, 2003; PASTORE et al., 2013).

A técnica do isolamento é largamente empregada na literatura como uma forma de buscar espécies microbianas produtoras de compostos enzimáticos, a fim de se obter enzimas com diferentes especificidades de substratos (LOPERENA et al., 2009; CAVALCANTI et al., 2006; FACCHIN, 2013; BARATTO et al., 2011).

Através da técnica de isolamento em placas contendo apenas o meio de cultura (PDA), vinte e sete fungos filamentosos foram encontrados no resíduo da ETE, sendo alguns deles mostrados na Figura 4.1. Os micro-organismos foram codificados com a sigla “M” seguido de numeração 1 a 27.

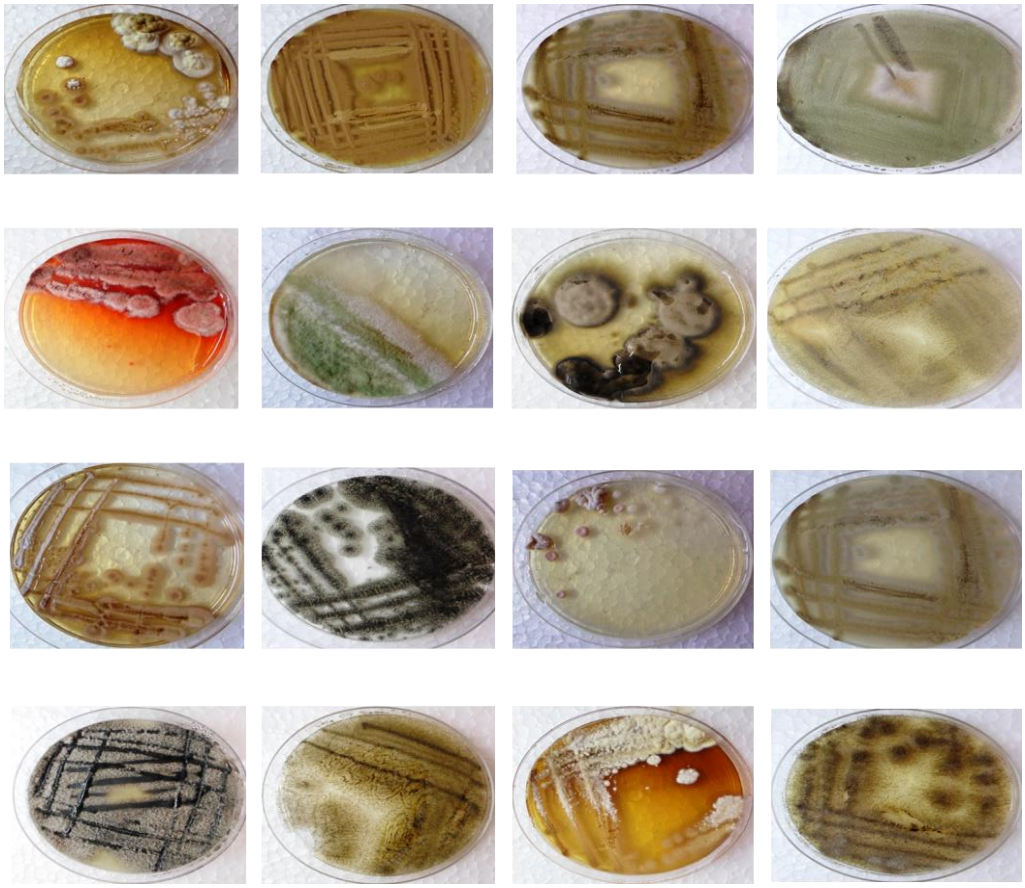


Figura 4.1 – Fungos filamentosos isolados do resíduo da ETE.

4.2 SELEÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS LIPOLÍTICOS

Na segunda etapa do trabalho, foi feita a seleção dos fungos filamentosos lipolíticos utilizando meio de cultura contendo (em % m/v) tributirina (1), peptona (2), extrato de levedura (0,1), cloreto de sódio (0,5) e Ágar (2) (FREIRE, 1996). A tributirina é um triglicerídeo que contém três moléculas de ácido butírico ligadas a um glicerol, liberadas no meio mediante sua hidrólise pela lipase (BUENO, 2012). Desta forma, inoculou-se os fungos filamentosos isolados em placas de Petri contendo o meio e incubou-se em estufa a 30°C por 5 dias. O IH (Índice de Hidrólise) foi medido pela formação de um halo incolor formado na placa, ocasionado pela hidrólise do triacilglicerídeo e quebra da emulsão pelos micro-organismos produtores de lipase. O cálculo para o índice está descrito na equação 4.1 a seguir (ROCHA et al., 2013):

$$\mathrm{IH} = \frac{Dt}{Dc} \tag{4.1}$$

Onde:

IH = Índice de Hidrólise;

Dt = Diâmetro total (Halo + colônia);

Dc = Diâmetro da colônia.

Dos 27 fungos isolados do resíduo, oito hidrolisaram o meio, formando o halo incolor. Isto significa que 30% das cepas obtidas têm capacidade de produzir lipase. O Índice de Hidrólise (IH) destes oito fungos é apresentado na Tabela 4.1. Para a FES foram selecionados os dois fungos filamentosos que apresentaram maior IH (1,5). Estes foram codificados a princípio como M5 e M13 (Figura 4.2).

Tabela 4.1 – Índice de Hidrólise dos micro-organismos isolados do resíduo, baseados na relação entre o diâmetro total (halo + colônia) e o da colônia.

Fungos filamentosos codificados	Diâmetro total (cm)	Diâmetro da colônia (cm)	Índice de Hidrólise (IH)
M5	1,2	0,8	1,50
M7	5,1	4,9	1,04
M11	4,6	4,4	1,05
M13	3,0	2,0	1,50
M20	1,7	1,5	1,13
M21	1,1	0,9	1,22
M22	1,5	1,4	1,07
M24	5,3	4,8	1,10

Figura 4.2 – Fungos filamentosos isolados do resíduo da ETE com maior IH.

O isolamento dos fungos filamentosos de resíduos com elevado teor de O&G vêm sendo empregado em várias pesquisas (CHATURVEDI et al., 2010; COIMBRA et al., 2012; GRIEBELER et al., 2011; QUEISSADA, 2009), tanto pelo caráter indutor do próprio meio para produção de lipases quanto pela questão de adaptação do micro-organismo ao substrato, sem muita exigência nutricional. O solo e resíduos agroindustriais são considerados principais habitats para populações microbianas, dentre os quais os fungos filamentosos (CAVALCANTI et al., 2006). Por isso o isolamento,

seleção e identificação de novas espécies com elevado potencial biotecnológico para produção de enzimas hidrolíticas é importante.

Com o objetivo de encontrar fungos filamentosos capazes de produzir lipases e biosurfactantes, Sperb et al. (2015) isolaram 24 fungos filamentosos de resíduos provenientes de refinarias de óleo vegetal e petróleo e os avaliaram quanto a produção de biosurfactantes e lipases. A presença e a qualidade das lipases foram estudadas por meio de dois métodos qualitativos: i) ensaio em placas, utilizando Rodamina B, onde ocorre formação de um halo fluorescente laranja devido a hidrólise do substrato oleoso; ii) pela visualização de um halo opaco no meio constituído de Tween 80 solúvel em água e meio nutriente. Com relação a produção de biosurfactantes, dois testes também foram realizados: testes de hemólise e de distorção ótica. A partir dos micro-organismos isolados, uma cepa identificada como *Aspergillus niger* e duas como *Rhizopus* sp. demonstraram potencial para a produção de ambos os compostos de interesse. Com isso, este estudo comprovou que micro-organismos oriundos de resíduos oleosos podem ser bons produtores de lipases e biosurfactantes.

Em seu estudo para avaliar o potencial biotecnológico para produção de lipases de fungos filamentosos isolados de amostras do solo, Pereira et al. (2014) encontraram o fungo *Hypocrea pseudokoningii* como um novo produtor com elevado potencial. Dos micro-organismos isolados, oito apresentaram alta atividade lipolítica, sendo três deles pertencentes ao gênero *Aspergillus.* Segundo os autores, há poucas publicações sobre o potencial lipolítico de cepas do *H. pseudokoningii,* com altos níveis de síntese de lipases extracelulares a partir de uma concentração de 10^7 esporos/mL. O artigo descrito vêm a confirmar a importância do isolamento para a descoberta de novos micro-organismos produtores destas enzimas.

Griebeler et al. (2011) também isolaram fungos filamentosos de resíduos agroindustriais com o objetivo de selecionar aqueles com elevado potencial de produção de lipases. Utilizando a análise qualitativa com tributirina como substrato, dos 24 fungos isolados, cinco foram selecionados como bons produtores da enzima. Os micro-organismos encontrados pertenciam aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

A identificação dos fungos filamentosos M5 e M13 selecionados para fermentação no estado sólido (FES) foi realizada pela empresa Micro-ID a partir da análise de sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e alinhamento das sequências de

nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no *GenBank*. Os resultados dos testes foram baseados em sequenciamento Sanger. Dessa forma, os micro-organismos estudados foram identificados como *Aspergillus fumigatus (*M5) e *Aspergillus terreus* (M13).

Os alinhamentos genéticos das espécies *A. fumigatus e A. terreus* são apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4, respectivamente. As espécies de *Aspergillus* são os principais agentes de decomposição presentes em solo e resíduos agroindustriais, portanto, possuem capacidade de produzir várias enzimas hidrolíticas (GAO et al., 2008), portanto vários grupos de pesquisa isolaram essa espécie e estudam suas enzimas. Em sua pesquisa, Cavalcanti et al. (2006) isolaram e identificaram vários fungos filamentosos provenientes de solo da Caatinga, obtendo como resultado que o gênero *Aspergillus* foi o segundo dominante, de acordo com o número de espécies identificadas. E dentre as espécies de *Aspergillus* encontradas estavam *A. fumigatus e A. terreus.*

Carvalho et al (2005) estudaram quatro espécies de *Aspergillus* quanto ao seu potencial de produção de lipases e suas propriedades cinéticas e de enantioseletividade. As lipases das espécies *A. terreus* e *A. niger* foram as que apresentaram os melhores resultados, tanto para termoestabilidade e atividade enzimática, quanto para enantioseletividade, comprovando desta forma a utilização destas como bons biocatalisadores de matéria orgânica.

Shi et al. (2014) estudaram as lipases purificadas de *Aspergillus terreus* e confirmaram o concluído por Carvalho et al. (2005) quanto a elevada atividade obtida por estes fungos, que apresentam também termoestabilidade, boa tolerância a pH, além de enantioseletividade e estabilidade em vários solventes orgânicos. Isso prova o grande potencial das enzimas e a capacidade produtora deste fungo.

Poucos trabalhos são descritos na literatura utilizando as lipases produzidas pelo fungo *A. fumigatus.* Rajan e Nair (2011) realizaram um estudo comparativo entre a fermentação submersa (FS) e a FES utilizando os fungos desta espécie. Shangguan et al. (2011) avaliaram as propriedades cinéticas do gene desta mesma espécie de fungo filamentoso clonado em uma *Escherichia coli* e Reinehr et al. (2014) avaliaram o potencial de esterificação das lipases produzidas por fungos desta espécie.

```
                    1        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120       130
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Banco_Aspergillusfum AGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTTTCGACGGCCGCCGGGGAGGCCCTGCGCCCCC
              MI003
            Consensus ....................................................................................................................................

                    131      140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240       250       260
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Banco_Aspergillusfum GGGCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
              MI003                                                                                 AAACTT-CAACAACGGATTTTT--GTTC-GGCATCGATGA-GAACGCAGCG
            Consensus ...........................................................................AAACTT.CAACAACGGATcTcT..GTTC.GGCATCGATGA.GAACGCAGCG

                    261      270       280       290       300       310       320       330       340       350       360       370       380       390
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Banco_Aspergillusfum AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGT
              MI003 AAA-GSGATAAGTAATGTGA-WTGCAGAAT-CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT-GCGCCCC-TGGTATTCCGGGGG-CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGT
            Consensus AAA.GcGATAAGTAATGTGA.tTGCAGAAT.CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT.GCGCCCC.TGGTATTCCGGGGG.CATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGT

                    391      400       410       420       430       440       450       460       470       480       490       500       510       520
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Banco_Aspergillusfum GTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACT
              MI003 GTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACT
            Consensus GTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCTGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACT

                    521      530       540       550       560       570       58882
                    |--------+---------+---------+---------+---------+---------+-|
Banco_Aspergillusfum TTATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
              MI003 TTATTTTCTAAGGT-GACCTCG-ATCAGGTTAGGGWTCCT
            Consensus TTATTTTCTAAGGT.GACCTCG.ATCAGGTaaGGataCCc......................
```

Figura 4.3 – Alinhamento genético do fungo M5 com o banco de DNA da empresa MicroID (segundo o laudo o micro-organismo apresenta 95% de identidade com o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*).

```
                 1        10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120       130
                 |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Banco_A.terreus    CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTATGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGGGGGCGA
        MI004    STTTCCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTATGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGGGGGCGA
      Consensus  ..cTcCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTATGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTATTGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGGGGGCGA

                 131     140       150       160       170       180       190       200       210       220       230       240       250       260
                 |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Banco_A.terreus  CTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGCAGTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA
        MI004    CTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGCAGTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA
      Consensus  CTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGCAGTCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGA

                 261     270       280       290       300       310       320       330       340       350       360       370       380       390
                 |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Banco_A.terreus  AGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGC
        MI004    AGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGC
      Consensus  AGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGC

                 391     400       410       420       430       440       450       460       470       480       490       500       510       520
                 |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------|
Banco_A.terreus  CCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGC
        MI004    CCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGC
      Consensus  CCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGC

                 521     530       540       550       560       570       580       590       600       610613
                 |--------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+--|
Banco_A.terreus  CGACGCATTTATTTGCAACTTGTTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
        MI004    CGACGCATTTATTTGCAACTTGTTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAAGGWWTGRWWCCCSG
      Consensus  CGACGCATTTATTTGCAACTTGTTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAaGgaggGataCCCgc.............................
```

Figura 4.4 – Alinhamento genético do fungo M13 com o banco de DNA da empresa MicroID (segundo o laudo o micro-organismo apresenta 100% de identidade com o fungo *Aspergillus terreus*).

4.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

Uma mistura de torta de babaçu com 20% (m/m) do resíduo coletado na ETE (após triagem e peneiramento para separação da fração ≤ 1,18 mm) foi utilizada como meio basal para a FES. Fermentações foram realizadas para ambos os fungos, identificados como *Aspergillus fumigatus* (M5) e *A. terreus* (conforme descrito no item 4.2) em béquer de 600 mL contendo 15 g da mistura de resíduos, em estufa a 30°C, circulação de ar úmido e 65% de umidade inicial. Esta umidade foi corrigida com uma solução de esporos com concentração inicial de 10^7 esporos/g. Fermentações em duplicatas foram realizadas para cada fungo.

A obtenção dos esporos foi realizada através do crescimento dos fungos filamentosos em estufa a 28°C por 7 dias em meio PDA. Uma solução estéril constituída de tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0) e 0,1% (v/v) de Tween 80 foi adicionada aos esporos obtidos, sendo estes raspados com bastão de vidro, formando a solução de esporos. O número de esporos foi quantificado através de contagem em microscópio óptico em câmara de Neubaeur.

4.3.1 Resíduos Empregados como Meio Basal na FES

A torta de babaçu, um resíduo proveniente da prensagem da amêndoa para extração do óleo de babaçu, foi fornecida pela empresa Tocantins Babaçu S. A (TOBASA). A torta foi moída e peneirada em peneiras do tipo Tyler, de forma a se obter diferentes tamanhos de partículas, sendo empregada somente a fração com tamanho ≤ 1,18 mm para fermentação. Esta torta apresentava pH 5,4 e sua composição química e distribuição granulométrica, após moagem, está apresentada nas Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente.

Tabela 4.2 – Composição química da torta de babaçu

Componente	% (m/m)
Lipídeos	16
Proteínas	20
Fibras	50
Cinzas	4
Umidade	10

Fonte: Silva, 2014.

Tabela 4.3 – Distribuição granulométrica da torta de babaçu

Abertura (mm)	Fração (%)
1,180	40
0,850	14
0,600	11
0,425	11
0,212	11
≤ 0,212	13

O resíduo proveniente do decantador primário da ETE (mistura de lodo primário e escuma) foi coletado da estação já seco e, após chegar ao laboratório, foi submetido a triagem para separação de materiais como sacos plásticos, palitos de pirulitos, dentre outros. Após esta triagem, este foi peneirado em peneiras do tipo Tyler, de forma a se obter somente a fração com tamanho ≤ 1,18 mm para fermentação. A caracterização do resíduo peneirado está descrita na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Caracterização do resíduo do decantador primário da ETE

Composição	Valor
Umidade (%)	30,2 ± 2,2
pH	5,2
Proteínas (mg/g)*	46,21 ± 1,02
Carboidratos Solúveis (mg/g)*	0,03 ± 0,00
Óleos e Graxas (mg/g)*	207,54 ± 7,04

* mg/g, em peso seco.

Imagens do resíduo bruto e peneirado estão ilustradas na Figura 4.5. Ambos os resíduos foram armazenados sob refrigeração (4ºC) até o momento de sua utilização.

Figura 4.5 – Resíduo proveniente da ETE: (1) Resíduo bruto, conforme recebido no laboratório; (2) resíduo bruto, após separação de sacos plásticos, palitos de pirulitos, entre outros e (3) resíduo peneirado em peneiras do tipo Tyler com granulometria ≤ 1,18 mm.

4.3.2 Produção de lipases por fungos *Aspergillus fumigatus* e *A. terreus* em FES

Os dois fungos cresceram e produziram a enzima no meio basal descrito no item anterior, demonstrando que a mistura de resíduos possui os nutrientes necessários ao metabolismo dos fungos. As Figuras 4.6 e 4.8 apresentam os resultados da avaliação do extrato enzimático dos fungos *A. fumigatus* e *A. terreus* em termos de atividade

enzimática, quantificada pelo método espectrofotométrico, pH e teor de umidade do leito durante as fermentações da mistura de torta de babaçu com 20% (m/m) do resíduo coletado na ETE.

Todas as FES foram conduzidas em estufa a 30°C com circulação de ar úmido. Testes preliminares quanto a capacidade de absorção da mistura de resíduos foram realizados, e a partir de 65% a água não era mais absorvida pelo substrato, ficando livre no meio. Portanto, a umidade de 65% foi definida para todas as fermentações.

A Figura 4.6 apresenta o perfil de produção de lipase, pH e umidade da mistura de torta e resíduo durante a fermentação do fungo *A. fumigatus*, apresentando atividade lipásica de 3,91 ± 1,09 U/g em 48 h de fermentação. Considerando o teor de umidade ao final da fermentação, houve queda de 10%, com valor inicial de 63% e final (com 72 h) de 53%.

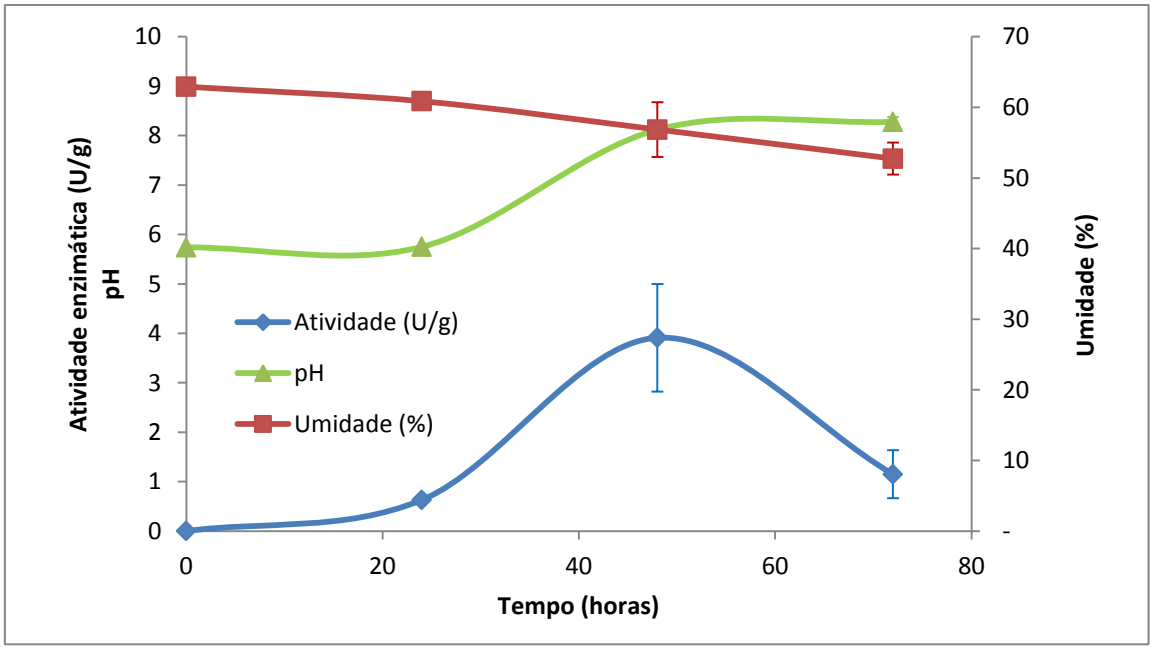


Figura 4.6 – Perfil de produção de lipase pelo fungo *A. fumigatus*, pelo método espectrofotométrico, pH e umidade durante FES com mistura de torta e resíduo. Médias e desvio-padrão de duas FES conduzidas nas mesmas condições.

O pH do leito aumentou de um valor inicial ácido (5,7) para um final básico (8,3). Houve um pico de atividade enzimática em 48 horas, com consequente aumento do pH do meio (8,1), indicando que a lipase produzida por este fungo é estável neste pH. Em um estudo para caracterização de lipases produzidas por este fungo, o autor

encontrou que está enzima é estável em pH variando entre 6,0 e 8,0 (SHANGGUAN et al., 2011).

Estudando fungos filamentosos da espécie *A. fumigatus* e utilizando como substrato para FES o farelo do arroz desengordurado, Rajan e Nair (2011) encontraram máxima atividade lipásica (8,13 U/mL) nas condições próximas a utilizadas neste trabalho, a 30°C e pH inicial de 8,5. Este trabalho demonstra a estabilidade das enzimas produzidas por este fungo em pH alcalino.

No presente estudo, a atividade lipásica encontrada em 72 h de FES apresentou uma redução de 71%, isso pode ser justificado pela desnaturação da enzima devido a redução da umidade, presença de proteases ou mesmo pelo aumento do pH do meio, tendo em vista que a cepa empregada neste trabalho é diferente da usada em outros estudos e pode produzir lipases com características diferentes.

O fungo *A. fumigatus* foi encontrado no resíduo da ETE pois é um saprófito que habita solos e matéria orgânica em decomposição, onde desempenha papel essencial na reciclagem de carbono e nitrogênio (SHANGGUAN et al., 2011). A Figura 4.7 mostra o crescimento do fungo após 72 horas de fermentação. Neste tempo, o fungo apresentou alta esporulação, visto pela presença de grande número de conidióforos.

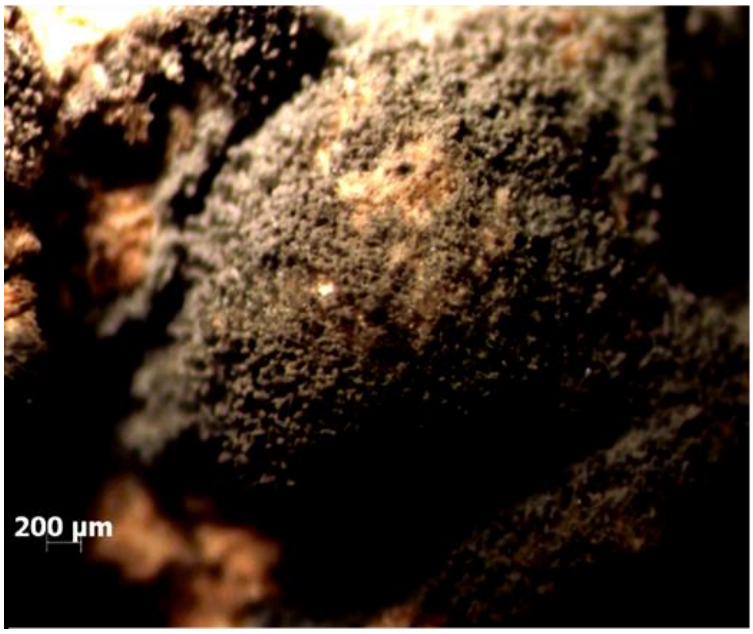


Figura 4.7 – Fotos tiradas com auxílio de lupa do fungo *A. fumigatus* crescendo na mistura (resíduo e torta de babaçu) após 72 horas de fermentação.

A Figura 4.8 apresenta o perfil de produção de lipase pelo método espectrofotométrico, pH e umidade da mistura de torta e resíduo durante a fermentação do fungo *A. terreus*, apresentando atividade de 1,1 ± 0,5 U/g em 48 h de fermentação. Após esse tempo a atividade enzimática diminuiu para 0,98 ± 0,2 U/g.

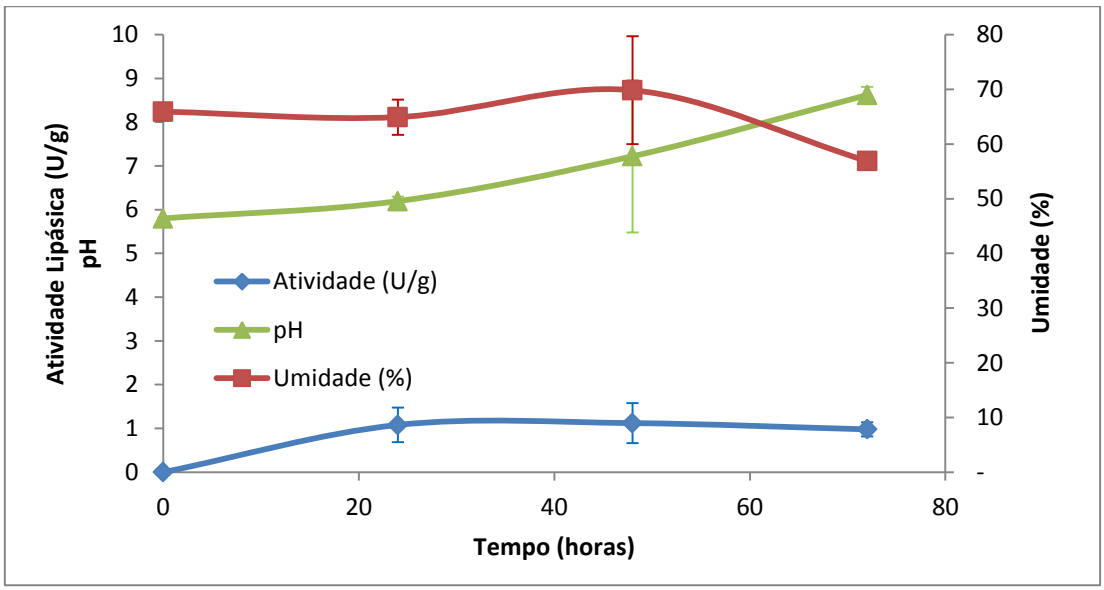


Figura 4.8 – Perfil de produção de lipase pelo fungo A. terreus, pelo método espectrofotométrico, pH e umidade durante FES com mistura de torta e resíduo. Médias e desvio-padrão de duas FES conduzidas nas mesmas condições.

A umidade inicial (65%) se mantém até 48 h, decaindo em seguida para 56,9% com 72 h de fermentação. O pH da mistura de torta e resíduo aumentou com o tempo de fermentação de 5,8, no início, para 8,6, após 72 h. Vários trabalhos descritos na literatura com lipases produzidas por esse fungo apresentam como condições favoráveis para maior atividade lipásica pH variando de 5,5 a 7,5 e umidade inicial acima de 70% (CARVALHO et al., 2005; HAMDY, ABO-TAHON, 2012; SETHI et al., 2013). O pH inicial descrito na literatura está dentro da faixa utilizado neste trabalho, porém a umidade foi mais baixa. Entretanto, a faixa de umidade que pode ser utilizada depende muito da capacidade de absorção da matriz usada. Um dos entraves da FES é a dificuldade de controlar o pH e a umidade, pois essas variações são difíceis de serem mensuradas “on-line” (BELLON-MAUREL et al., 2003).

Em seu estudo sobre as propriedades cinéticas de lipase produzida pelo fungo *A. terreus*, Carvalho et al. (2005) obtiveram como condições favoráveis para elevada

atividade enzimática pH de 5,5 e temperatura na faixa de 35 a 40°C. Hamdy e Abo-Tahon (2012), estudando esta mesma enzima, também encontraram maiores atividades em pH variando de 5,5 a 6,5, com valores acima de 7,5 apresentando as menores atividades. Carvalho et al. (2005) também estudaram a estabilidade enzimática desta lipase, constatando que esta apresenta estabilidade em pH entre 5 e 8, em valores acima destes as enzimas são instáveis.

Sethi et al. (2013) empregou o fungo *A. terreus* para FES em torta de mostarda com o objetivo de produzir lipases, e avaliou a influência das condições ambientais (pH e temperatura), nutricionais (carbono, nitrogênio, íons metais, vitaminas) e umidade inicial. Os autores encontraram como condições ideais para maior atividade da enzima: pH inicial de 6, temperatura de 30°C, 96 horas de incubação, lactose e persulfato de amônia como fontes adicionais de carbono e nitrogênio, respectivamente, além de umidade inicial de 80%. Apesar de as condições iniciais de pH e temperatura serem as mesmas empregadas nesta pesquisa, todos os outros parâmetros estudados pelos autores foram diferentes. Estes concluíram que para o meio estudado, o fungo necessita de fontes adicionais de carbono e nitrogênio, além de umidade acima de 70% para obtenção de maiores atividades enzimáticas.

Considerando os baixos valores de atividade lipásica, outro método de quantificação foi avaliado, o qual determina, por titulação, os ácidos graxos liberados a partir dos triglicerídeos. Este método utiliza um substrato natural e permite a quantificação de lipases “verdadeiras” (JAEGER et al., 1999). Para essa quantificação, outra FES, com tempo de fermentação de 48 horas, foi realizada e ambos os métodos analíticos (titulométrico e espectrofotométrico) foram empregados (Tabela 4.5), a fim de se obter o mais eficiente para a quantificação. O substrato empregado no método espectrofotométrico foi o p-nitrofenillaurato e no titulométrico azeite de oliva, que apresentam estrutura química diferente, incluindo tamanho das cadeias carbônicas e presença de insaturações.

A mistura de resíduos fermentada apresentou atividade lipásica para os fungos *A. fumigatus* e *A. terreus* de 5,56 e 2,44 U/g, pelo método espectrofotométrico, e de 21,58 U/g e 18,56 U/g, pelo método titulométrico, respectivamente. Portanto, comparando ambos os métodos, os maiores valores de atividade foram obtidos pelo titulométrico, isso pode ser justificado pelo tipo de substrato utilizado em cada metodologia. Uma vez que o azeite de oliva (substrato empregado no método

titulométrico) é constituído de triacilglicerídeos, que são substratos naturais das lipases, as enzimas produzidas por ambos os fungos podem ser consideradas “verdadeiras” uma vez que apresenta elevada atividade com o emprego deste substrato.

As lipases diferenciam-se das esterases pela especificidade enzima-substrato. Esterases hidrolisam triacilglicerídeos de cadeia carbônica curta (no máximo dez átomos de carbono) e ésteres simples, enquanto as lipases possuem especificidade por cadeias carbônicas longas (acima de dez átomos de carbono). Logo, substratos como azeite de oliva, que apresentam em sua composição 80% de ácido oleico (C:18:1), e em menores quantidades ácidos linoleico e linolênico, são os mais indicados para quantificação das lipases (JAEGER et al., 1999; BUENO, 2012; MELLO, PINHEIRO, 2012).

Além da especificidade enzima substrato outra justificativa para os diferentes valores de atividade lipásica de ambos os fungos nas duas metodologia seria a desnaturação da enzima pelo solvente empregado no método espectrofotométrico. Uma vez que não foi realizado um estudo em relação a estabilidade das lipases produzidas por esses fungos em solventes orgânicos o dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para solubilização do paranitrofenil laurato, pode desestabilizar essas enzimas.

O fenômeno de ativação interfacial também pode ser uma justificativa para o aumento da atividade lipásica pelo método titulométrico. Umas das características da lipase é o aumento de sua atividade em função dos substratos insolúveis, que formam emulsão. Uma vez que nessa metodologia o azeite de oliva é emulsionado, essa interface óleo-água pode ativar a enzima, com consequente aumento de sua atividade (SHARMA et al., 2001).

Tabela 4.5 – Comparação de atividade lipásica medida por titulometria e espectrofotometria, pH e umidade em 48 horas de FES da mistura de torta e resíduo com os dois fungos estudados.

Características da torta fermentada	***A. fumigatus***	***A. terreus***
Atividade lipásica (espectrofotométrico) (U/g)	5,56	2,44
Atividade lipásica (titulométrico) (U/g)	21,58	18,56
Umidade (%)	65,1	61,6
pH	8,3	7,5

Na Figura 4.9 é possível avaliar visualmente o crescimento do fungo *A. terreus* no substrato utilizado. Verifica-se que o micro-organismo foi capaz de crescer em todo o meio basal. A Figura 4.10 é uma foto do fungo tirada, com auxílio de lupa, na superfície e no interior da mistura (resíduo e torta de babaçu) após 72 horas de fermentação, mostrando que *A. terreus* colonizou efetivamente os grânulos, crescendo na forma de hifas aéreas aderidas à superfície dos grãos, e produzindo esporos.

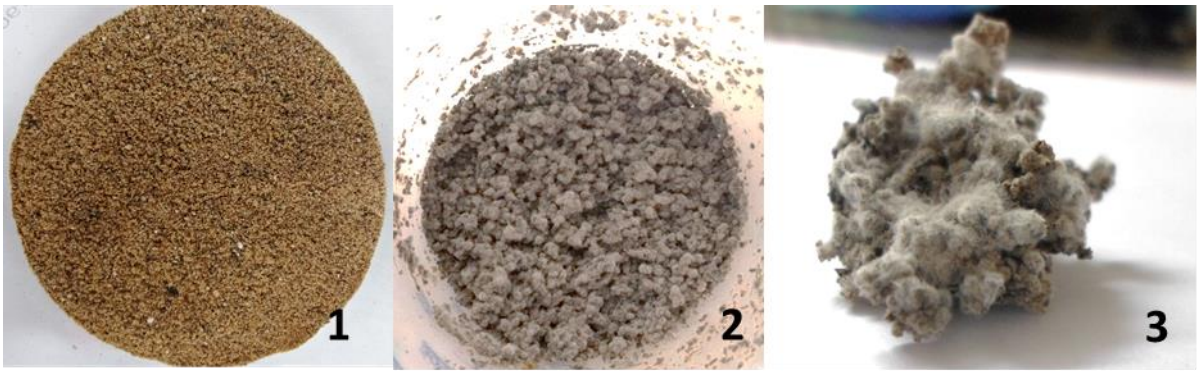


Figura 4.9 – Crescimento de *A. terreus* após 48 horas de fermentação a 30ºC e umidade inicial de 65%. (1) Foto do substrato antes da adição do inóculo; (2) Após 48 horas de fermentação e (3) Foto de um aglomerado de partículas fermentado.

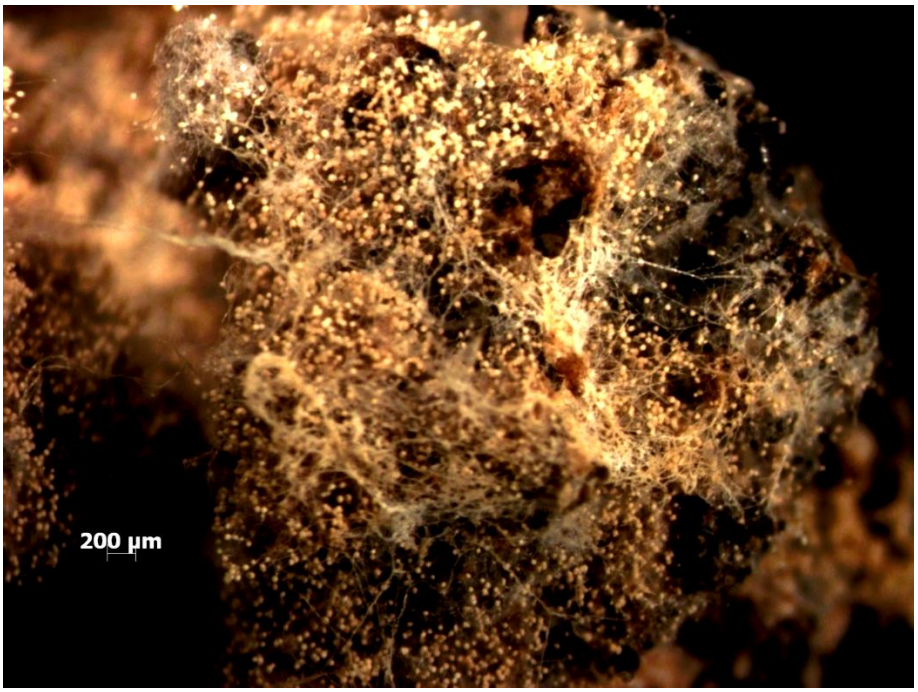


Figura 4.10 – Foto tirada com auxílio de lupa do fungo *A. terreus* crescendo na mistura (resíduo e torta de babaçu) após 72 horas de fermentação.

4.3.3 Obtenção do Preparado Enzimático Sólido (PES)

Para obtenção do PES, a torta fermentada (após 48 horas de fermentação) foi seca em estufa a 40°C por 48 horas, com injeção de ar seco. Após o tempo de secagem, o PES (com umidade inferior a 10%) foi armazenado em temperaturas inferiores a -20°C. O processo de produção do PES está esquematizado na Figura 4.11.

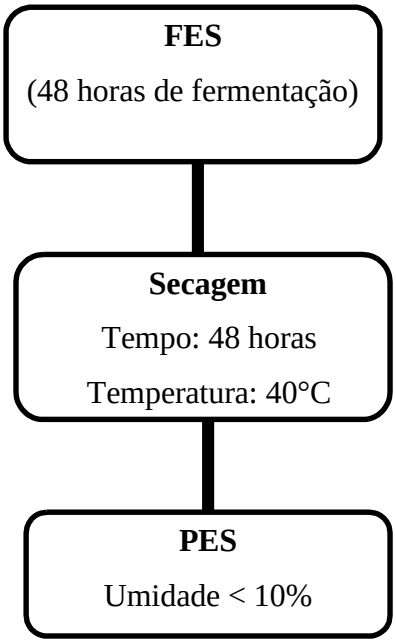


Figura 4.11 – Fluxograma de produção do PES.

A atividade enzimática do PES produzido por ambos os fungos foi medida após secagem em estufa a 40ºC, com circulação de ar seco, por 48 horas. As lipases produzidas por *A. fumigatus* perderam atividade durante o processo de secagem, já as do *A. terreus* permaneceram ativas, sendo estas escolhidas para continuidade do estudo. A lipase secretada pelo fungo *A. terreus* é termoestável (GULATI et al., 1999), por isso não ocorreu desnaturação a 40°C, já a enzima do *A. fumigatus* pode ter desnaturado a essa temperatura, perdendo sua atividade.

O PES foi estocado em freezer à temperatura de aproximadamente – 20°C. Alterações nos parâmetros: umidade, pH e atividade enzimática ao longo do tempo de estocagem sob congelamento foram monitoradas (Figura 4.12) para avaliar a vida útil do PES sob essa temperatura. Pode-se observar que tanto o pH quanto a umidade não

variaram ao longo do tempo de estocagem, já a atividade da enzima aumentou consideravelmente na segunda semana, de uma atividade inicial 14 U/g para 29 U/g de massa seca da torta. Porém, a partir da terceira semana de estocagem, o PES perdeu completamente sua atividade.

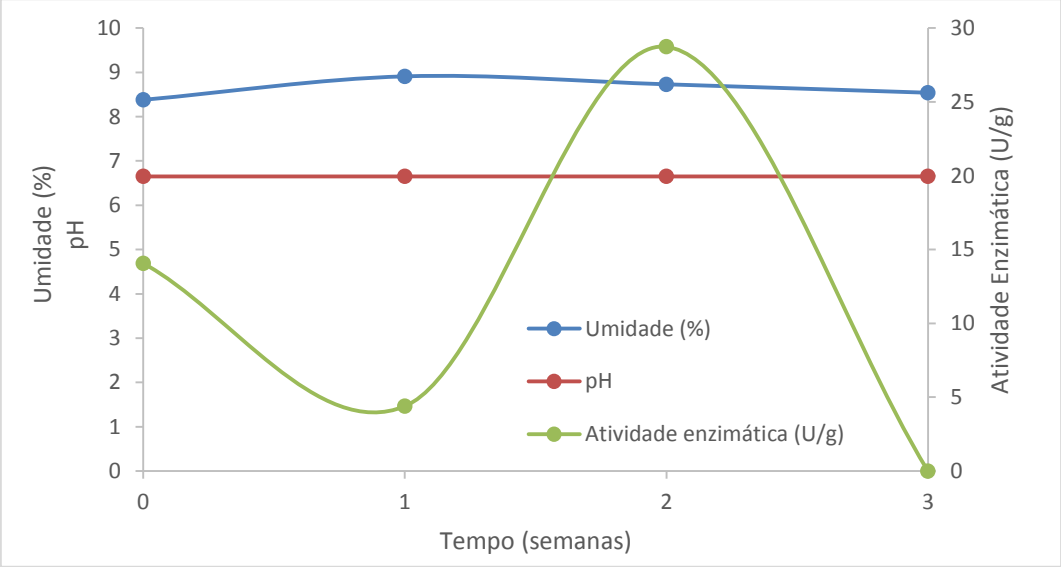


Figura 4.12 – Estabilidade enzimática do PES do fungo *A. terreus.*

Uma justificativa para a variação da atividade enzimática no PES seria a questão da amostragem para extração enzimática e posterior medida analítica da atividade. O PES é constituído de grânulos secos do meio fermentado, onde as enzimas não estão dispostas de maneira uniforme em todo o meio, e por mais que ocorra maceração manual destes, eles ainda apresentam tamanhos distintos. Quando uma quantidade do PES é retirada para extração e análise pode ser que nesta massa a concentração de enzima seja baixa ou inexistente causando, com isso, erro no estudo do perfil de estabilidade. Portanto, uma pesquisa mais aprofundada desse perfil, levando em conta esses erros de amostragem, deve ser realizada com o intuito de verificar a estabilidade desta enzima no PES a baixa temperatura.

Como não houve tempo hábil na presente pesquisa para o desenvolvimento aprimorado de um perfil de estabilidade, o tempo de estocagem de duas semanas foi determinado pelo perfil descrito na Figura 4.12.

4.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Esta etapa do trabalho teve por objetivo avaliar a hidrólise dos O&G presentes na escuma gerada em ETE, através da liberação dos ácidos graxos livres no meio. As enzimas presentes no PES produzido pelo fungo *A. terreus* (item 4.3.3) foram adicionadas na escuma diluída em esgoto sanitário, ambos coletados no Centro Experimental de Saneamento Ambiental (CESA) da Escola Politécnica da UFRJ, para promover a hidrólise enzimática das gorduras presentes nestas amostras. Os itens a seguir descrevem a caracterização do esgoto sanitário e da escuma, a condução do processo de hidrólise assim como os resultados obtidos.

4.4.1 Caracterização do Esgoto Sanitário e da Escuma

O esgoto sanitário foi coletado na entrada do CESA, sem nenhum tratamento prévio para retirada de gorduras nem sólidos grosseiros (Figura 4.13). Ao longo do trabalho foram realizadas seis coletas que, após a retirada de alíquotas para as análises pertinentes, foram armazenadas sob refrigeração (4ºC). O esgoto foi caracterizado em termos de pH, demanda química de oxigênio (DQO) e óleos e graxas (O&G). Todas as metodologias estão descritas na seção 3.2.1 (Métodos analíticos).

Figura 4.13 – Ponto de coleta do esgoto bruto empregado nos experimentos.

Na Tabela 4.6 estão as médias e respectivos desvios-padrão obtidas das análises de DQO, pH e O&G do esgoto bruto. A DQO do esgoto bruto é descrita na literatura em torno de 250 a 1000 mg/L (VON SPERLING, 2005), já em relação aos O&G estes variam bastante, pois dependem do modo de vida da população, mas em geral suas concentrações estão em torno de 40 a 170 mg/L (CHIABAI, REBOUÇAS, GONÇALVES, 2005; OLIVEIRA et al., 2014 e VON SPERLING, 1996). Por se tratar de um esgoto gerado em um campus universitário, este apresenta valor de DQO abaixo dos descritos na literatura para esgoto doméstico.

Tabela 4.6 – Caracterização do esgoto utilizado ao longo do trabalho.

Parâmetro	**Valor**
pH	7,1 ± 0,1 *
DQO (mg/L)	138 ± 10 *
O&G (mg/L)	164 **

* Média e desvio-padrão de 6 coletas. ** Valor de uma coleta.

A escuma foi coletada na superfície da caixa de areia do tratamento preliminar do CESA (Figura 4.14). O período de estocagem de cada coleta era de um mês pois, embora seu armazenamento fosse sob refrigeração, poderia ocorrer hidrólise das gorduras pelos próprios micro-organismos presentes no resíduo, influenciando assim os resultados dos testes de hidrólise. Portanto, foram realizadas seis coletas de escuma, sendo sua caracterização feita apenas em termos de concentração de O&G, obtendo-se valores na faixa de 5777 a 23475 mg/L.

Figura 4.14 – Ponto de coleta da escuma empregada nos experimentos.

4.4.2 Condução do processo e Resultados da Hidrólise Enzimática

Com o intuito de se obter diferentes concentrações de O&G na escuma esta foi diluída com esgoto doméstico bruto. Neste trabalho, esta mistura (escuma e esgoto) foi denominada apenas ESCUMA, sendo as concentrações de O&G avaliadas de: 750 mg/L, 1500 mg/L e 3000 mg/L.

Para o processo de hidrólise enzimática o PES foi adicionado diretamente na ESCUMA, sendo sua atividade enzimática fixada em 24 U ou 0,24 U/mL. Os testes foram conduzidos em *erlenmeyers* de 500 mL contendo 100 mL da ESCUMA, agitados em *shaker* a 150 rpm e 30°C. Para avaliação da cinética de produção de ácidos livres, alíquotas de 10 mL foram retiradas em 0, 4, 8 e 24 horas de hidrólise. Em todos os testes de hidrólise foi realizado um branco reacional, que consistia somente na ESCUMA, sem a presença do PES.

Primeiramente, os testes de hidrólise foram conduzidos com a utilização de 0,1 g/L de azida sódica, a fim de inibir a ação dos micro-organismos presentes ESCUMA que, por ventura, poderiam consumir os ácidos livres liberados pela enzima (DUARTE et al., 2015). Como a escuma apresenta elevadas concentrações de O&G e sua variabilidade é alta, foi definido para este trabalho três concentrações (750, 1500 e 3000 mg/L) iniciais, com o objetivo de avaliar o comportamento da enzima nas diferentes

concentrações de substratos, além de monitorar a produção de AV (ácidos voláteis) ao longo da hidrólise, uma vez que produções muito elevadas desse parâmetro geram inibição das arqueas metanogênicas na digestão anaeróbia.

A Tabela 4.7 apresenta os resultados dos testes de hidrólise enzimática para ESCUMA contendo 750 mg/L de O&G com e sem azida sódica. Os parâmetros avaliados foram DQO total e solúvel, Ácidos livres e Carboidratos Solúveis.

Como a adição do PES alterava as características da ESCUMA, antes da adição do PES uma alíquota foi retirada e quantificada. Já a denominação ESCUMA + PES refere-se à mistura de ESCUMA adicionada do PES, monitorada ao longo do tempo. Percebe-se, na Tabela 4.7, que houve um aumento de todos os parâmetros avaliados com a adição do PES, nas duas condições empregadas. Em relação à produção de Ácidos Livres (AL), as duas condições apresentaram características distintas. Com adição de azida houve um aumento na concentração de AL até 8 horas de hidrólise (21 para 27 µmoles/mL), e sem adição de azida houve diminuição da concentração a partir das primeiras 4 horas (21 para 13 µmoles/mL). Este comportamento pode ser explicado pelo consumo dos AL pelos micro-organismos presentes no meio. Mesmo com azida, a concentração empregada pode ser considerada baixa para a quantidade elevada de micro-organismos, haja visto que tanto a escuma quanto o esgoto não passam por nenhum processo de desinfecção e pode apresentar concentração de micro-organismos alta. Este comportamento de redução dos AL formados também foi observado por Santos (2014) e Valente et al.(2010).

As análises de carboidratos e DQO solúveis apresentaram a mesma característica dos AL, aumentando de 513 para 907 mg glicose/L e de 3520 para 7410 mgO_2/L, respectivamente, em 24 horas de hidrólise com azida. Já no teste sem azida ocorreu um aumento nas primeiras 4 horas de reação, seguido de redução até as 24 horas, de 784 para 235 mg glicose/L e de 3920 para 1330mgO_2/L. Concluindo-se, assim, que os micro-organismos presentes utilizavam tanto os AL quanto os carboidratos solúveis como substratos em seu metabolismo.

Os óleos e gorduras são utilizados por micro-organismos lipolíticos como fonte de carbono em seu metabolismo (CARVALHO, 2010). Como tanto no PES quanto no esgoto pode haver concentração elevada destes micro-organismos, tempos acima de 4 horas são suficientes para a degradação destas substâncias.

Tabela 4.7 – Teste de Hidrólise da ESCUMA na concentração de 750 mg O&G/L com e sem azida.

Amostra	Tempo (horas)	DQO total (mgO_2/L)	DQO solúvel (mgO_2/L)	Ácidos Livres (µmoles/mL)	Carboidratos Solúveis (mg glicose/L)
ESCUMA	-	10.700 ± 34	97 ± 2	8 ± 1	63 ± 1
ESCUMA + PES Com azida	0	19.300 ± 27	3.520 ± 11	21 ± 1	513 ± 3
	4	26.900 ± 100	4.220 ± 7	23 ± 0	649 ± 3
	8	29.150 ± 166	5.240 ± 8	27 ± 0	642 ± 4
	24	29.500 ± 10	7.410 ± 18	24 ± 2	907 ± 2
ESCUMA	-	14.100 ± 11	149 ± 2	9 ± 0	40 ± 0
ESCUMA + PES Sem azida	0	18.400 ± 15	3.230 ± 12	17 ± 1	694 ± 9
	4	23.500 ± 117	3.920 ± 4	21 ± 1	784 ± 2
	8	19.600 ± 55	2.150 ± 7	19 ± 1	441 ± 11
	24	19.600 ± 12	1.330 ± 6	13 ± 1	235 ± 0

As lipases apresentam comportamentos cinéticos diferentes dependendo da concentração de substrato presente no meio reacional (CONTESINI et al., 2010). Considerando que a escuma apresenta valores elevados de O&G, maiores concentrações desse composto foram empregadas nos testes de hidrólise, com a finalidade de avaliar o comportamento cinético da enzima e dos micro-organismos presentes no PES e na ESCUMA. Sendo assim, a Figura 4.15 apresenta os resultados experimentais da concentração de ácidos livres presentes na ESCUMA ao longo do tempo. Nesta Figura, os termos controle e ESCUMA se referem à mistura de esgoto e escuma sem e com adição do PES, respectivamente.

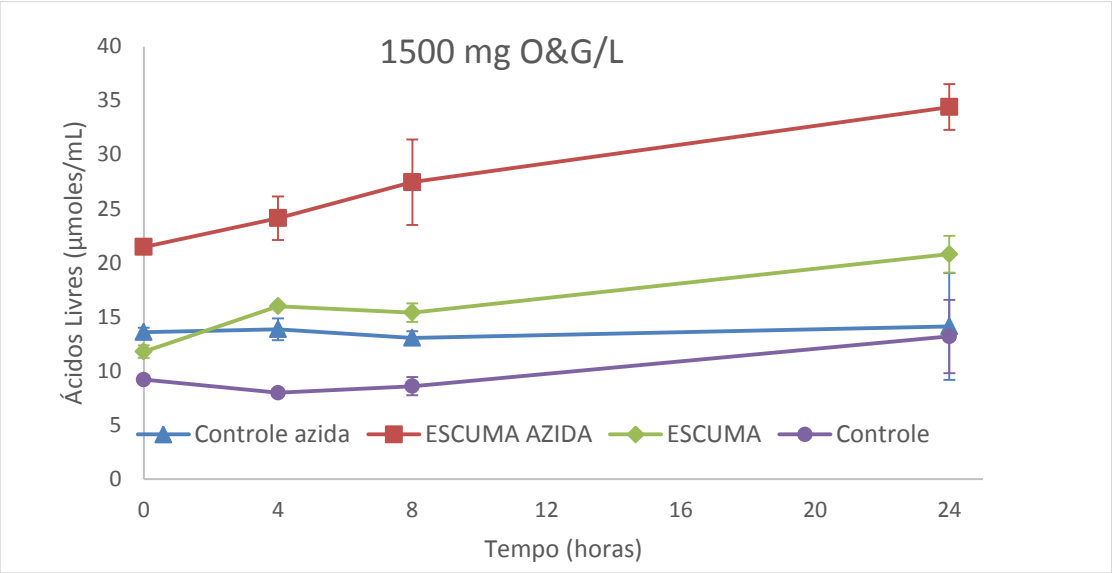


Figura 4.15 – Variação da concentração de ácidos livres com o tempo na hidrólise da ESCUMA contendo 1500 mg/L de O&G com e sem azida.

A Tabela 4.8 apresenta a concentração inicial e final (após 24 horas de teste) dos ácidos livres presentes no controle (sem adição do PES) e na ESCUMA, assim como a variação final destes, na concentração de 1500 mg O&G/L.

Tabela 4.8 – Concentração de Ácidos Livres inicial e final na hidrólise do controle (sem adição de PES) e ESCUMA, com e sem azida, ambos com concentração de 1500 mg O&G/L.

Condição	**Ácidos Livres (µmoles/mL)**		
	Inicial	**Final**	**Variação**
CONTROLE AZIDA	13,6 ± 0,4	14,1 ± 4,9	0,5
ESCUMA AZIDA	21,5 ± 0,6	34,4 ± 2,1	12,9
CONTROLE	9,2 ± 0,3	13,2 ± 3,4	4
ESCUMA	11,8 ± 0,6	20,8 ± 1,7	9

A partir da Figura 4.15 e Tabela 4.8 é possível avaliar a hidrólise enzimática da ESCUMA e seus respectivos controles. A enzima foi capaz de atuar em uma maior concentração do substrato, promovendo sua hidrólise e liberando AL para o meio. Essa liberação de ácidos livres foi maior na ESCUMA do que no controle nas amostras com

e sem azida. Neste experimento, a ESCUMA apresentou uma concentração final de AL nas amostras com azida maior que na concentração de 750 mg/L, 34 e 24 µmoles/mL, respectivamente, com um incremento de 10 µmoles/mL na concentração de 1500 mg/L, em comparação à concentração anteriormente estudada. A amostra sem adição de azida também foi maior nas 24 horas, apresentando concentrações de AL de 21 e 13 µmoles/mL, respectivamente. A hidrólise nas amostras sem azida tiveram uma variação de 9, porém a curva de AL nesta condição não apresentou linearidade, uma vez que as concentrações diminuíram em um intervalo de 4 a 8 horas de reação. A maior concentração encontrada foi com azida em 24 horas de reação, com a concentração de AL apresentando linearidade e aumentando com o tempo de hidrólise.

Uma vez que a enzima foi capaz de hidrolisar o meio contendo uma concentração de 1500 mg/L, a máxima concentração empregada neste trabalho foi de 3000 mg/L de O&G com o propósito de verificar a atuação da enzima com maiores concentrações desse substrato. Os ácidos livres produzidos nesta concentração estão apresentados na Tabela 4.9. Os resultados obtidos foram similares aos encontrados para750 mg/L (21 mg/L) em 4 horas. A amostra denominada ESCUMA refere-se à mistura de escuma e esgoto, sem adição do PES, já a denominação ESCUMA + PES é a mistura de escuma e esgoto adicionada do PES, monitorada ao longo do tempo.

Tabela 4.9 – Teste de Hidrólise na concentração de 3000 mg O&G/L, sem azida.

Amostra	**Tempo (horas)**	**Ácidos Livres (µmoles/mL)**
ESCUMA	--	13,60
ESCUMA + PES	0	15,20
	4	22,40

A Alcalinidade Total (AT) e Ácidos Voláteis (AV) são parâmetros de monitoramento importantes na digestão anaeróbia, pois a partir destes é possível controlar a capacidade de tamponamento do sistema. Valores da relação AV/AT acima de 0,3, dentro dos reatores, indicam distúrbios no processo de digestão devido a elevada concentração dos ácidos voláteis (CHERNICHARO, 2007). Na Tabela 4.10 estão os

valores de AT e AV para as concentrações de O&G estudadas no trabalho, além da sua relação, a amostra com o traço pontilhado no lugar do tempo refere-se ao controle.

Tabela 4.10 – Valores de Alcalinidade Total e Ácidos Voláteis da ESCUMA, sem azida, nos testes de hidrólise com diferentes concentrações iniciais de O&G.

Amostra	**O&G (mg/L)**	**Tempo (horas)**	**AT (mg $CaCO_3$/L)**	**AV (mg HAc/L)**	**AV/AT**
ESCUMA		--	646	518	0,8
ESC.+PES	750	0	850	850	1,0
		4	799	878	1,1
ESCUMA		--	702	763	1,1
ESC.+PES	1.500	0	1098	1368	1,2
		4	1278	1397	1,1
ESCUMA		--	1503	1872	1,2
ESC.+PES	3.000	0	1755	2578	1,5
		4	2079	2837	1,4

A elevada concentração de AV obtida nas análises pode ser proveniente da alta concentração de O&G presente tanto na ESCUMA quanto no PES, pois há um aumento desta com a adição do preparado enzimático. Houve um aumento dos AV durante a hidrólise (4 horas) em todas as concentrações de O&G empregadas no trabalho, isto pode ser pela ação das lipases sobre esse composto, visto que esses ácidos derivam, primariamente, da decomposição dos lipídeos. Como pode ser observado na Tabela 4.10 na concentração de 1500 e 3000 mg/L de O&G a AT aumentou consideravelmente durante às 4 horas de hidrólise, isso pode ser explicado devido a ação dos micro-organismos presentes na escuma sobre compostos, tais como proteínas, sais inorgânicos e sabões.

Segundo Valente et al. (2010), o aumento da alcalinidade no efluente de pescado durante a digestão anaeróbia pode ser proveniente da liberação de cátions na metabolização desses compostos pelos micro-organismos presentes no meio, uma vez

que há micro-organismos tanto na escuma quanto no esgoto. Essa justificativa pode ser utilizada no teste de hidrólise realizado neste trabalho, sendo estes responsáveis pelo aumento da alcalinidade total na mistura. Já na concentração de 750 mg/L a AT diminuiu com o tempo de hidrólise, em virtude da concentração de micro-organismos não serem suficientes para metabolizarem os compostos, liberando os cátions, e os íons bicarbonatos gerados (maiores responsáveis pela alcalinidade do sistema) neutralizarem a acidez dos AV liberados.

Santos (2014) aplicou uma enzima comercial (Lipolase 100 L), produzida pela Novozymes Latin America, obtida através de fermentação submersa de um organismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae)*, na hidrólise da escuma gerada em reator UASB tratando esgoto doméstico. Com uma atividade lipásica de 120 U/mL e tempo de hidrólise enzimática da escuma de 24 horas, a autora obteve resultados satisfatórios em relação à hidrólise deste resíduo, com produções de AL na ordem de 180 $\mu mol.mL^{-1}$ quando empregou 1% desta enzima. Porém, um grande entrave da aplicação de enzimas comerciais é o custo elevado.

Os resultados obtidos no presente trabalho quanto aos ácidos livres liberados na hidrólise da mistura foram similares ao encontrado por Duarte (2013) com hidrólise termofílica de efluente sintético de indústria de pescado, utilizando um PES produzido pelo fungo *Penicillium simplicissimum*. Com um efluente contendo 1500mg/L de O&G e empregando concentração de PES de 0,67 U/mL, a autora obteve 27 µmoles/mL de ácidos livres após 24 horas de hidrólise. Este resultado se assemelha ao produzido neste trabalho com adição de azida, nas concentrações de 750 e 1500 mg/L em 8 e 24 horas de hidrólise, respectivamente.

Leal et al. (2006) também investigaram a utilização de um pré-tratamento enzimático com PES produzido pelo fungo *P. restrictum* para tratamento biológico de efluente de laticínios. Com uma atividade enzimática inicial de 22 U/g, a autora utilizou 0,1% (m/v) do preparado enzimático e obteve, para uma concentração de 1000 mg O&G/L, temperatura de 35°C e 24 horas de reação, 10 µmoles/mL de ácidos livres. Os valores obtidos para os ácidos livres em todas as concentrações neste trabalho foram superiores a este. Igualmente, Mobarak-Qamsari et al. (2012) estudaram a hidrólise enzimática de efluente sintético de laticínios, porém utilizando 10% (v/v) de um extrato enzimático com 0,3 U/mL de atividade lipásica produzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa.* Com concentração de 1000 mg O&G/L e temperatura de 35°C obteve 20

µmoles/mL de ácidos livres após 48 horas de reação, resultado esse similar aos obtidos neste trabalho, entretanto com tempo de hidrólise muito superior.

A Tabela 4.11 apresenta uma visão geral do teste nas diferentes concentrações de O&G estudadas, em relação aos ácidos livres produzidos. Os valores de AL foram próximos, variando de 4 e 7 µmoles/mL nas primeiras 4 horas de hidrólise. Porém, a maior concentração de O&G (3000 mg/L) apresenta uma relação AV/AT alta. Portanto, a menor concentração de O&G (750 mg/L) foi escolhida para a digestão anaeróbia, assim como o tempo de hidrólise de 4 horas.

Valores de 4 e 7 µmoles/mL de ácido livres produzidos durante a hidrólise de 4 horas parecem insignificantes, mas quando usada uma correlação obtida entre DQO solúvel e concentração de AL (DQO = 246,2 x AL, com r^2 = 0,943, no Apêndice - A), estes valores representariam um aumento de DQO solúvel na faixa de 985 a 1723 mg/L. Comparada à DQO do esgoto bruto (138 mg/L), haveria um aumento de 7 a 12 vezes na carga aplicada no reator anaeróbio (considerando somente a fração solúvel). Se esta carga aumentada se provar biodegradável e não interferir na digestão anaeróbia, em especial na etapa de metanogênese, pode-se aumentar consideravelmente a produção de biogás.

Tabela 4.11 – Concentração de ácidos livres em 0 e 4 h de hidrólise da mistura sob diferentes concentrações de O&G, sem azida.

Concentração de O&G (mg/L)	**Ácidos Livres (µmoles/mL)**		
	0 horas	**4 horas**	**Variação**
750	17 ± 1	21 ± 1	4
1500	12 ± 1	16 ± 0	4
3000	15 ± 1	22 ± 1	7

4.5 FORMAS DE APLICAÇÃO DO PES

O esquema apresentado na Figura 4.16 apresenta duas formas de aplicação do PES como adjuvante no aproveitamento da escuma acumulada nos reatores anaeróbios

em operação nas ETE. Uma forma de aplicação seria a adição direta do PES à escuma removida do reator (diluída ou não em esgoto bruto ou tratado) e retorno imediato desta mistura à alimentação do reator anaeróbio. Outra forma de aplicação seria o emprego do PES em uma etapa de pré-hidrólise enzimática e dosagem do hidrolisado (após um tempo de hidrólise seguida de separação do PES) na alimentação do reator anaeróbio.

Por se tratar de um resíduo complexo e com elevadas concentrações de O&G, a alimentação direta da mistura de escuma e PES na corrente afluente do reator (primeira forma de aplicação) pode gerar problemas operacionais, tais como o acúmulo de compostos de hidrólise mais lenta, assim como de partículas do próprio PES no interior do reator anaeróbio. Dessa forma, uma etapa de pré-hidrólise e separação do PES (segunda forma de aplicação) seria interessante para disponibilizar somente os compostos de mais fácil assimilação para os micro-organismos (SANTOS, 2014).

Estas duas formas de aplicação foram avaliadas no presente trabalho, sendo a metodologia e resultados obtidos apresentados nos itens a seguir.

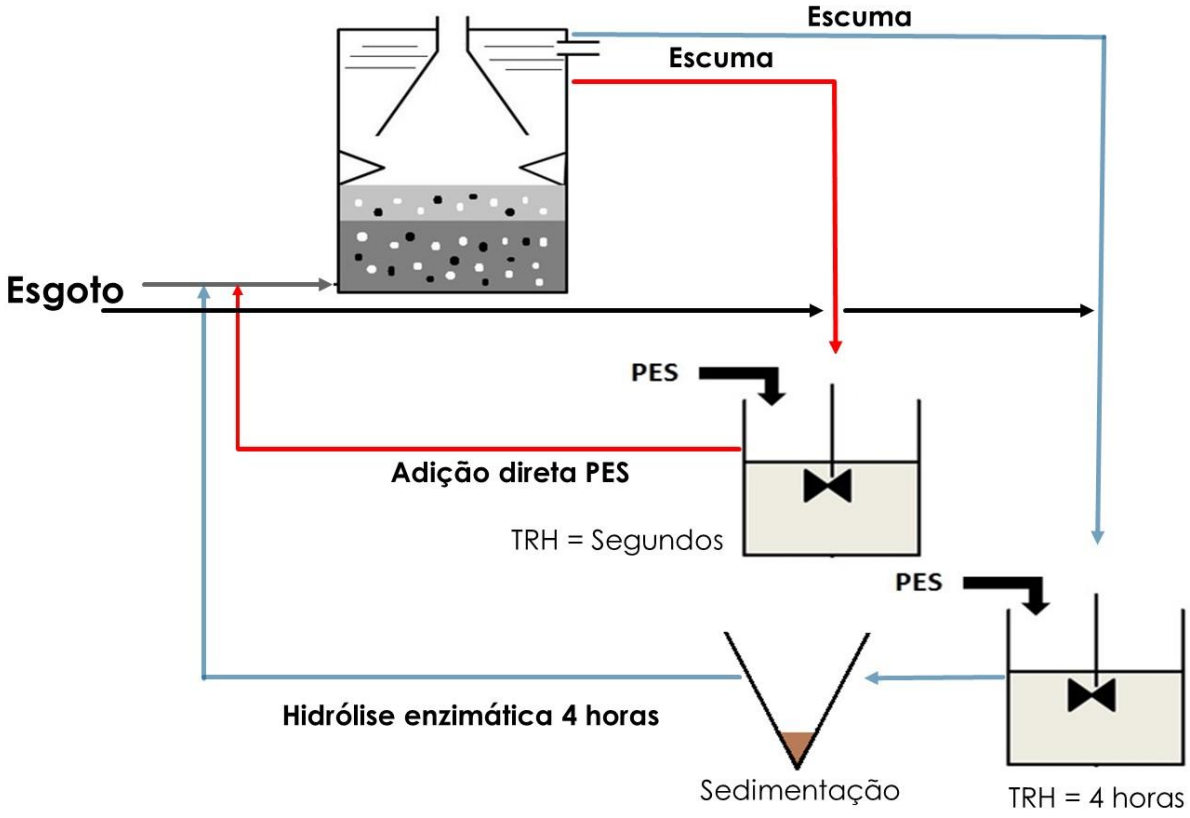


Figura 4.16 - Esquema simplificado de duas formas de aplicação do PES no reator UASB.

4.5.1 Efeito da forma de aplicação do PES na biodegradabilidade anaeróbia da escuma: adição direta do PES e pré-hidrólise enzimática

A fim de avaliar o efeito da hidrólise enzimática na digestão anaeróbia, dois experimentos foram conduzidos com diferentes formas de aplicação do PES à ESCUMA, antes dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia, a saber:

- **No primeiro experimento**, considerando que nos testes de hidrólise anteriormente estudados os micro-organismos presentes no esgoto e na escuma consumiam a DQO solúvel durante a hidrólise, a hipótese de adição direta do PES aos frascos penicilina foi estudada como uma forma de liberar os produtos da hidrólise diretamente para as bactérias presentes no lodo anaeróbio;
- **No segundo experimento**, avaliou-se a biodegradabilidade da ESCUMA após uma etapa de pré-hidrólise de 4 h com PES, porém sem sedimentação e separação do preparado ao final da hidrólise.

A Figura 4.17 mostra um esquema dos dois experimentos conduzidos. Os experimentos foram conduzidos em modo batelada em frascos do tipo penicilina de 100 mL com 90% do volume útil. Nestes experimentos foi utilizado o lodo do digestor anaeróbio da ETE como inóculo, com concentrações de sólidos totais, totais fixos e totais voláteis de 32323, 19117 e 13206 mg/L, respectivamente, sendo mantido sob refrigeração (4ºC) até o momento de sua utilização. A quantidade de lodo utilizada nos frascos penicilina foi calculada para se manter uma concentração inicial de 2900 mg SSV/L.

O volume útil dos frascos foi composto, no primeiro experimento, de lodo anaeróbio, ESCUMA e PES. Já no segundo experimento a ESCUMA foi submetida a uma etapa de pré-hidrólise enzimática com PES por 4 horas, sendo a ESCUMA hidrolisada misturada ao lodo anaeróbio nos frascos penicilina. A concentração de 750 mg/L de O&G foi fixada na ESCUMA e utilizada nos dois experimentos, assim como a atividade enzimática de 0,24 U/mL.

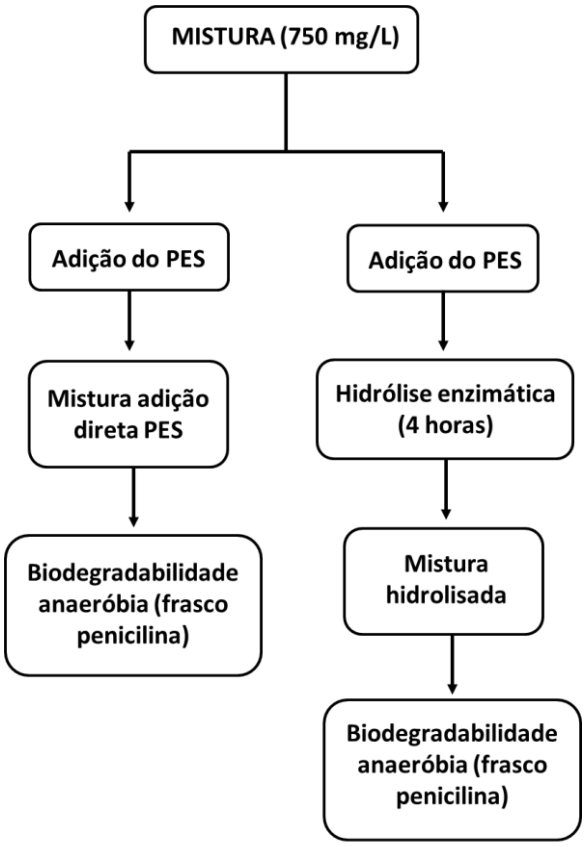


Figura 4.17 – Esquema simplificado dos experimentos de adição direta de PES e pré-hidrólise seguidas de biodegradação anaeróbia.

No segundo experimento, após a pré-hidrólise enzimática, o PES também foi transferido para os frascos, não havendo sua decantação e separação. Um controle foi realizado apenas com a ESCUMA, sem adição de PES. O pH de todas as amostras foi ajustado para 7,0 ± 0,2 antes de seu contato com o lodo anaeróbio.

Os frascos foram então fechados com septos de borracha, lacrados com lacres de alumínio em lacradores manuais e incubados a 30°C até estabilização da produção de biogás. Para avaliação da biodegradabilidade anaeróbia os parâmetros monitorados foram: eficiência de remoção de DQO, produção e composição de biogás. A produção do biogás foi monitorada através do deslocamento do êmbolo de seringas plásticas graduadas de 60 mL conectadas aos frascos por meio de escalpes, como ilustrado na Figura 4.18.

Figura 4.18 – Frasco penicilina conectado à seringa para medição do biogás no ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.

No que se refere à avaliação da eficiência de remoção de DQO, as alíquotas iniciais das amostras foram retiradas: logo após mistura do esgoto com escuma (controle), após adição do PES na ESCUMA (Adição Direta PES) e ao final da hidrólise (ESCUMA Hidrolisada). A DQO final foi realizada no último dia do ensaio, no sobrenadante, quando a produção de biogás tornava-se constante, sendo primeiramente recolhido o biogás produzido para análise cromatográfica e, posteriormente, feita a abertura dos frascos.

A Figura 4.19 apresenta o perfil de produção de biogás durante os experimentos de biodegradabilidade anaeróbia após as duas condições de aplicação de PES testadas: adição direta de PES aos frascos penicilina, pré- hidrólise da ESCUMA por 4 horas, assim como o controle (sem o PES). A medida do biogás foi feita a cada dia até estabilização de sua produção.

Não houve produção de biogás no controle durante os 5 dias de ensaio. E a estabilização da produção nas duas condições avaliadas com enzimas ocorreu no 2° dia de ensaio. A Figura 4.20 mostra que 90% do biogás era composto de CO_2, sendo o metano produzido apenas no ensaio com ESCUMA hidrolisada, enquanto vapor d'água estava presente em ambas as condições e, praticamente, na mesma concentração.

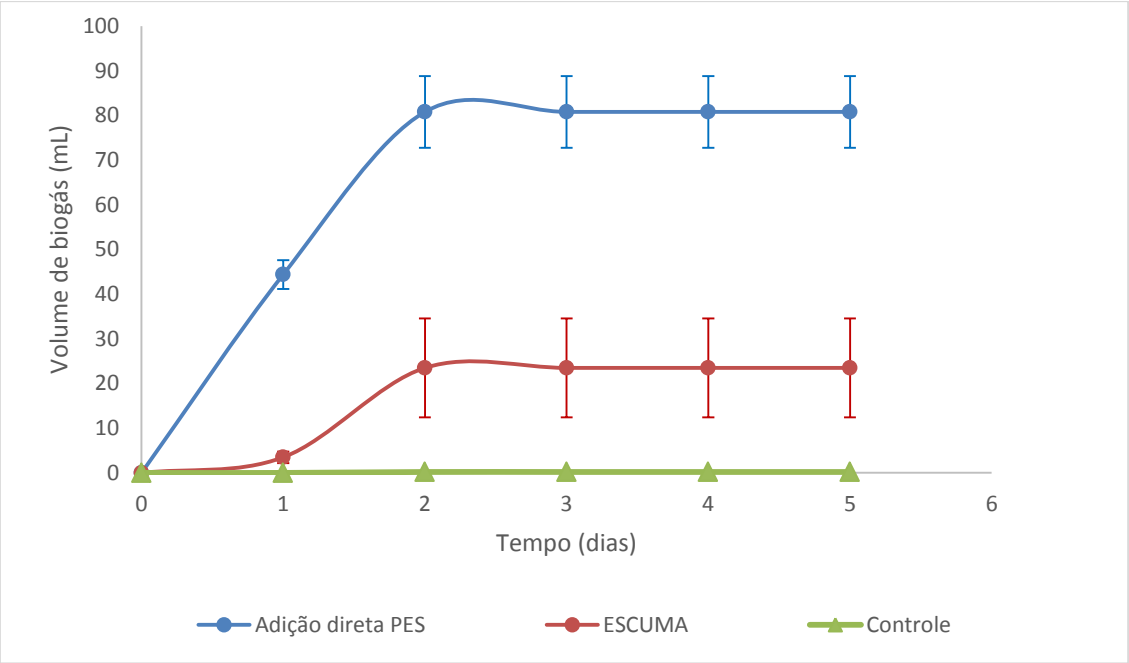


Figura 4.19 – Perfil de produção de biogás do controle, mistura com adição direta de PES e mistura hidrolisada por 4 horas. Médias e desvio-padrão de 4 réplicas.

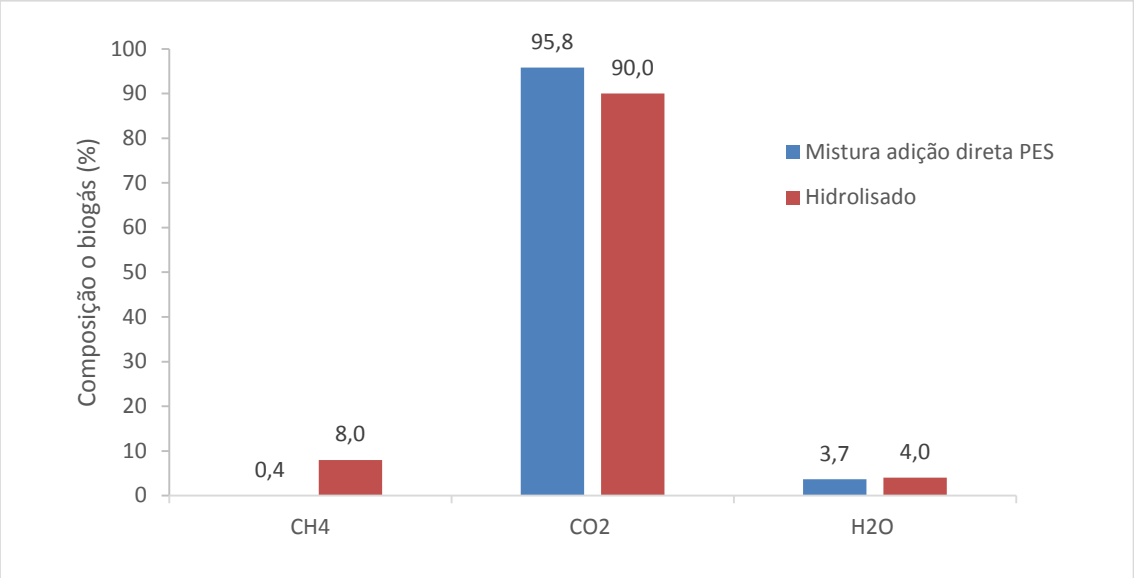


Figura 4.20 – Composição do biogás na adição direta do PES e adição da mistura hidrolisada.

A produção elevada de CO_2 pode ser justificada pela respiração celular dos micro-organismos presentes no PES. Como ainda havia O_2 no meio e a temperatura de 30°C é ideal para o crescimento microbiano, estes podem ter consumido o substrato produzindo este gás. Outro fator é a composição química do PES, que por não ser

totalmente conhecida, pode ter algum composto tóxico que inibiu as arqueas metanogênicas.

A inibição das arqueas metanogênicas, principalmente as hidrogenotróficas, também pode ser justificada pela acidificação do meio por conta do CO_2 produzido na fase acidogênica e dos AGCL (Ácidos Graxos de Cadeia Longa) liberados na hidrólise.

A Tabela 4.12 apresenta os resultados dos experimentos de biodegradabilidade anaeróbia com adição direta de PES aos frascos penicilina e com ESCUMA hidrolisada. Analisando os dados em relação às condições iniciais dos experimentos, a adição direta do PES na ESCUMA aumenta consideravelmente a DQO total e solúvel. Ainda assim, remoções de DQO similares foram obtidas nos ensaios controle e com ESCUMA hidrolisada, 62 e 63%, respectivamente. Apesar de haver remoção de DQO no controle, este não produziu biogás, sendo uma hipótese para explicar tal resultado a produção ser tão pequena que a pressão não foi suficiente para o deslocamento do êmbolo da seringa.

Enquanto a adição direta do PES produziu biogás, mas sem metano, a ESCUMA hidrolisada produziu biogás com baixo percentual de metano, resultando em uma produção específica de metano (PEM) muito baixa, de 0,6 e 3,2 mL CH_4/g DQO removida, respectivamente.

Os baixos valores finais de pH podem justificar a baixa produção de metano nos ensaios com enzima. Provavelmente, as elevadas concentrações de ácidos voláteis introduzidas como PES e, principalmente, com a ESCUMA hidrolisada, resultou em inibição das arqueas metanogênicas (ALEXANDRE et al., 2011).

Em função dos resultados apresentados, a adição direta do PES se mostrou inviável, primeiramente devido ao pior resultado no tratamento anaeróbio, e segundo pela impossibilidade de reutilização do lodo, devido a incorporação do PES. Outro motivo seria a possibilidade de problemas operacionais na aplicação em reatores anaeróbios do tipo UASB, pois a quantidade de sólidos na alimentação do reator seria elevada. Dessa forma, essa alternativa foi descartada, sendo empregada somente a pré-hidrólise enzimática nos ensaios posteriores.

Tabela 4.12 – Resultados dos experimentos de biodegradabilidade anaeróbia com adição direta do PES e Escuma Hidrolisada.

Amostras	**Condição Inicial**			**Condição Final**				**Remoção de DQOt (%)**
	pH	**DQO total (mg/L)**	**DQO solúvel (mg/L)**	**pH**	**DQO total (mg/L)**	**DQO solúvel (mg/L)**	**Volume de biogás (mL) a 30°C/1 atm**	
Controle	7,2	2.750 ± 225	144 ± 10	7,1	1.050 ± 99	356 ± 16	0	62
Adição direta PES	7,2	13.900 ± 17	1.870 ± 6	5,1 ± 0,0	6.871 ± 300	6.116 ± 308	81 ± 8	51 ± 2
ESCUMA Hidrolisada	7,2	12.600 ± 20	2.270 ± 12	5,5 ± 0,2	4.604 ± 858	3.972 ± 438	24 ± 11	63 ± 7

4.5.2 Avaliação de diferentes dosagens de escuma na biodegradação anaeróbia de esgoto

Estes experimentos consistiram na avaliação da biodegradabilidade anaeróbia do esgoto acrescentado da ESCUMA bruta ou hidrolisada. Foram adicionadas ao esgoto diferentes diluições da ESCUMA bruta (Controle) ou hidrolisada, com o intuito de verificar o aumento da produção de biogás e metano, assim como a eficiência de remoção de DQO. Nesta etapa, cuja representação esquemática é apresentada na Figura 4.21, os sólidos contidos no PES não foram adicionados aos frascos penicilina, sendo separados ao final da hidrólise por decantação.

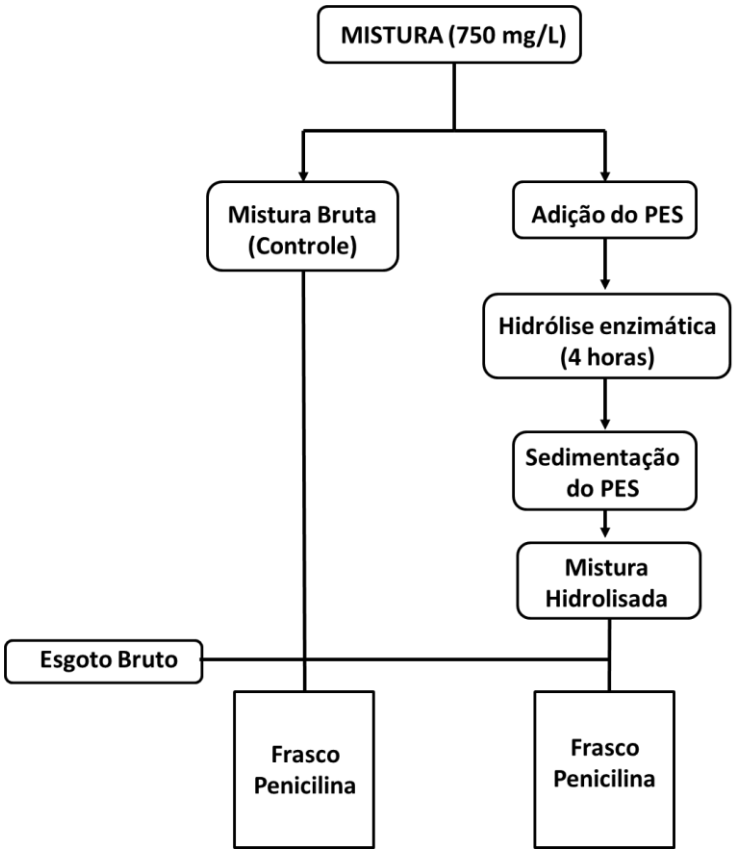


Figura 4.21 – Representação esquemática dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com diferentes diluições de mistura bruta e hidrolisada em esgoto.

Estes experimentos também foram conduzidos em modo batelada em frascos tipo penicilina de 100 mL com 90% do volume útil composto de lodo anaeróbio e

diferentes proporções (de 1 a 100% v/v) de ESCUMA bruta (Controle) ou ESCUMA hidrolisada. As diferentes concentrações de lodo, ESCUMA bruta ou hidrolisada e esgoto (para obtenção da proporção desejada) são apresentadas na Tabela 4.13, juntamente com um controle contendo somente lodo e esgoto doméstico.

Tabela 4.13 – Composição de lodo, esgoto, escuma bruta e hidrolisada nos experimentos.

% Escuma no Esgoto	Tipo de escuma	Lodo(mL)	Esgoto(mL)	EscumaBruta (mL)	Escuma Hidrolisada (mL)
0	(Esgoto bruto)	15	75		
1%	Bruta	15	74,1	0,9	
	Hidrolisada	15	74,1		0,9
5%	Bruta	15	70,5	4,5	
	Hidrolisada	15	70,5		4,5
10%	Bruta	15	66	9	
	Hidrolisada	15	66		9
25%	Bruta	15	52,5	22,5	
	Hidrolisada	15	52,5		22,5
50%	Bruta	15	30	45	
	Hidrolisada	15	30		45
75%	Bruta	15	7,5	67,5	
	Hidrolisada	15	7,5		67,5
100%	Bruta	15		75	
	Hidrolisada	15			75

Nestes experimentos o lodo utilizado foi oriundo de um reator UASB em operação em indústria de abate de aves localizada no Rio de Janeiro. A quantidade de lodo utilizada nos frascos penicilina foi calculada para se manter uma concentração

inicial de 2900 mg SSV/L. E a fim de reduzir a concentração de matéria orgânica biodegradável adsorvida ao lodo, este foi incubado, em cada frasco penicilina, por um período de 24 horas antes de seu contato com a ESCUMA bruta ou hidrolisada. O pH da ESCUMA foi ajustado para 7,0 ± 0,2 antes do contato destas com o lodo anaeróbio. Os frascos foram fechados com septos de borracha, lacrados com lacres de alumínio em lacradores manuais e incubados a 30°C até a estabilização da produção de biogás.

Para avaliação da biodegradabilidade anaeróbia os parâmetros monitorados foram: eficiência de remoção de DQO, produção e composição de biogás. A produção do biogás foi monitorada através do deslocamento do êmbolo de seringas plásticas graduadas de 60 mL conectadas aos frascos por meio de escalpes. No que se refere à avaliação da eficiência de remoção de DQO, as alíquotas iniciais das amostras foram retiradas do: esgoto bruto, da ESCUMA bruta e após hidrólise (ESCUMA hidrolisada). A DQO final foi realizada no último dia do ensaio (DE 7 A 9 DIAS), quando a produção de biogás tornava-se constante, sendo primeiramente recolhido o biogás produzido para análise cromatográfica e, posteriormente, feita a abertura dos frascos.

Parâmetros como DQO total e solúvel, volume de biogás, percentual de metano, eficiência de remoção de DQO total e Produção Específica de Metano em relação a DQO aplicada foram avaliados e estão descritos na Tabela 4.14. Analisando essa tabela, verifica-se que o pH final manteve-se entre 7,2 e 7,7, valores mais adequados à digestão anaeróbia. O pH é um fator ambiental extremamente importante para uma operação adequada dos processos anaeróbios. Uma vez que as arqueas metanogênicas apresentam estabilidade com pH entre 6,0 e 8,0, valores acima e abaixo destes devem ser evitados, pois podem inibir por completo esses micro-organismos e, consequentemente, a produção de metano (CHERNICHARO, 2007).

Apesar de o pH final das amostras estar dentro do intervalo adequado para a digestão anaeróbia, nos experimentos com esgoto bruto e ESCUMA a 1% a remoção de DQO total e a produção de metano foram muito baixas. Uma explicação para tal seria a baixa concentração de matéria orgânica biodegradável aplicada nestas condições, característica do esgoto bruto gerado no campus universitário. Versiani (2005) classificou o esgoto produzido no campus universitário da UFRJ como “fraco”, apresentando valores médios de DQO e DBO de 167e 82 mg/L, respectivamente. A autora, para obter um esgoto com carga orgânica próxima a de um esgoto doméstico

convencional, adicionou lodo desidratado e digerido da CEDAE após o tratamento preliminar.

Tabela 4.14 – Resultados dos ensaios de biodegradabilidade com diferentes diluições de escuma bruta ou hidrolisada no esgoto.

% Escuma	Condição Inicial			Condição Final[c]			
	DQOt (mg/L)	DQOs (mg/L)	pH	DQOt (mg/L)	DQOs (mg/L)	Biogás(mL, 30°C/1 atm	CH_4 (%)
0 - Esgoto [a]	152 ± 2	63 ± 5	7,4 ± 0,1	134 ± 13	90 ± 2	6,5 ± 2,1	23,4± 22,2
Bruta 1%	220	65	7,5 ± 0,1	172 ± 11	82 ± 23	8,5 ± 1,3	27,9 ± 8,7
Hidro 1%	229	77	7,4 ± 0,1	216 ± 0	113 ± 10	3,5 ± 0,7	27,3 ± 6,3
Bruta 5%	494	71	7,3 ± 0,1	116 ± 19	62 ± 3	8,8 ± 1,3	75,9 ± 16,9
Hidro 5%	538	134	7,2 ± 0,1	138 ± 10	80 ± 2	12,5 ± 0,7	63,2 ±25,2
Bruta 10%	837	79	7,4 ± 0,1	275 ± 11	241 ± 3	17,7 ± 0,6	86,0 ± 6,6
Hidro 10%	924	205	7,3 ± 0,1	458 ± 71	241 ± 6	17,0 ± 2,8	84,0 ± 3,6
Bruta 25% [b]	1158	55	7,6 ± 0,1	141 ± 14	40 ± 11	5,0	70,3
Hidro 25%	1189	229	7,7 ± 0,1	232 ± 29	79 ± 4	9,5 ±0,7	78,5 ±1,4
Bruta 50%	2181	60	7,6 ± 0,0	274 ± 23	58 ± 14	7,5 ±0,7	68,7 ±1,7
Hidro 50%	2242	409	7,5 ± 0,0	441 ± 30	56 ± 3	17,3 ±2,5	75,1 ±2,2
Bruta 75%	3204	66	7,6 ± 0,1	230 ± 69	83 ± 20	12,5 ±3,5	85,8
Hidro 75%	3296	589	7,5 ± 0,0	606 ± 94	188 ± 19	20,0 ±4,2	74,3 ±2,0
Bruta 100%	3545	68	7,4 ± 0,1	390 ± 33	75 ± 26	8,5 ±3,5	72,8 ±28,9
Hidro 100%	3647	649	7,5 ± 0,0	748 ± 122	216 ± 38	28,0	75,8 ±0,9

[a] média e desvio-padrão de 5 réplicas.[b] média e desvio-padrão de 3 réplicas. pH inicial ajustado para 7,0 em todas as condições.[c] após 7 – 9 dias de incubação.

Tabela 4.14 – Resultados dos ensaios de biodegradabilidade com diferentes diluições de escuma bruta ou hidrolisada no esgoto (cont.).

% Escuma	Remoção DQOt (%)		PEM ($mLCH_4/gDQO_{aplic}$)
0 - Esgoto [a]	11,8 ± 8,3	--	133,4
Bruta 1%	22,0 ± 4,8	--	143,7
Hidro 1%	5,7 ± 0,0	--	55,6
Bruta 5%	76,6 ± 3,9	12,1 ± 4,9	180,3
Hidro 5%	74,3 ±1,8	40,7 ± 1,6	195,8
Bruta 10%	67,1 ± 8,5	--	242,5
Hidro 10%	50,4 ± 7,7	--	206,1
Bruta 25%	81,8 ± 2,0	37,2 ± 17,2	40,5
Hidro 25%	76,6 ± 3,4	65,7 ± 0,9	83,6
Bruta 50%	80,9 ±1,8	3,7	31,5
Hidro 50%	76,4 ± 1,6	86,4 ± 0,5	77,3
Bruta 75%	88,7± 2,6	--	44,6
Hidro 75%	78,0 ± 0,5	69,1± 2,5	60,1
Bruta 100%	83,0 ± 1,3	--	23,3
Hidro 100%	75,4 ± 4,4	66,7± 6,9	77,6

[a] média e desvio-padrão de 5 réplicas. [b] média e desvio-padrão de 3 réplicas.

No presente trabalho à medida que se aumentou o % de ESCUMA, a carga biodegradável aplicada aumentou, levando a uma maior remoção de DQO total e produção de metano. A maior remoção de DQO total obtida foi 89% com adição de 75% de ESCUMA nos frascos.

Na Figura 4.22, no entanto, percebe-se que os percentuais de remoção de DQO total foram maiores com adição da ESCUMA bruta, sem a etapa de hidrólise. E na Figura 4.23 verifica-se que maiores valores finais de DQO são obtidos com a ESCUMA hidrolisada, em comparação à ESCUMA bruta. Em comparação à DQO final obtida com esgoto bruto (134 mg/L), somente a ESCUMA 5% manteria valores de DQO similares, com os maiores % apresentando valores de DQO final elevados.

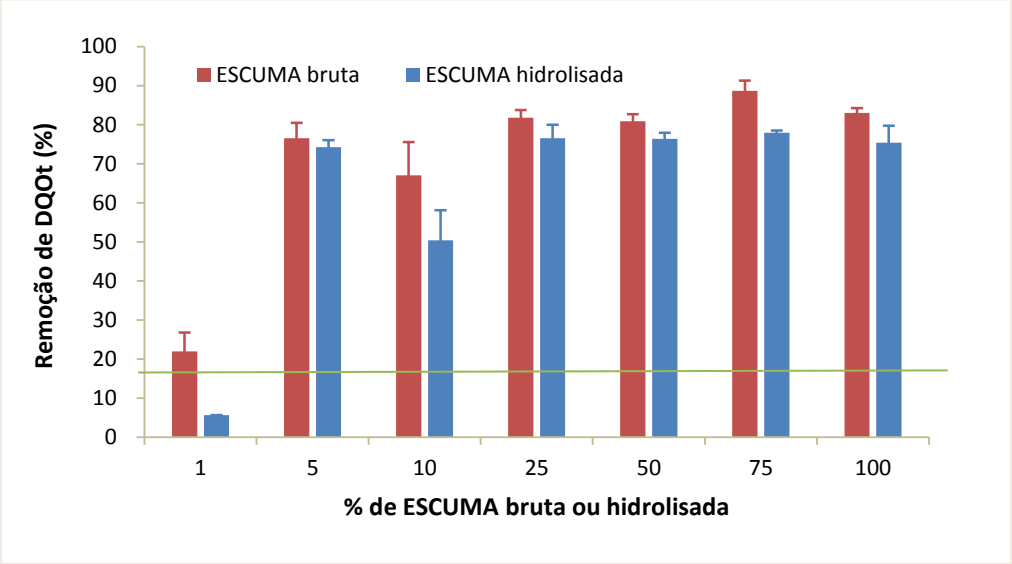


Figura 4.22 – Remoção de DQO total (%) para diferentes concentrações de escuma bruta ou hidrolisada adicionadas ao esgoto. A linha verde representa o % remoção obtido com esgoto bruto.

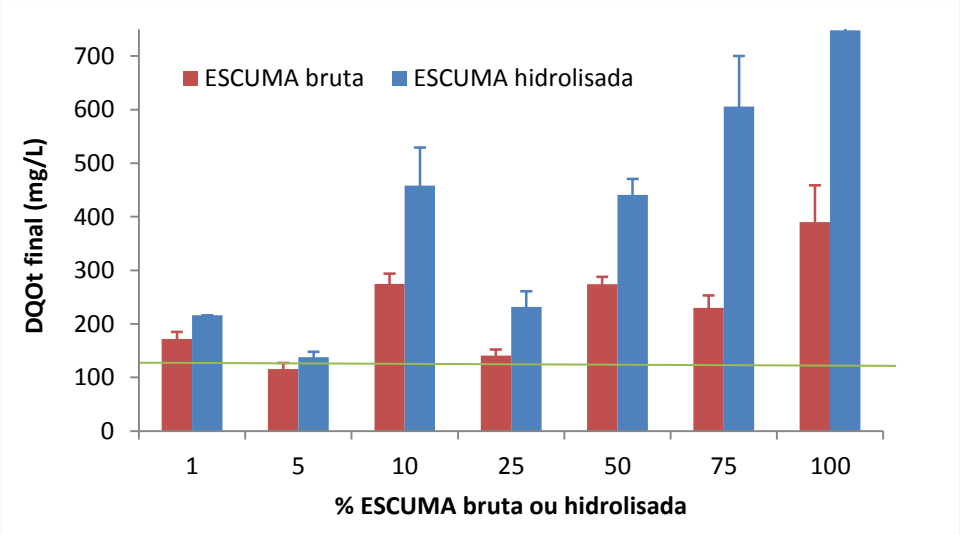


Figura 4.23 – Valores de DQO total final para diferentes concentrações de escuma bruta ou hidrolisada adicionadas ao esgoto. A linha verde representa a DQO final obtida com esgoto bruto.

Em relação à DQO solúvel inicial e final, verifica-se que houve aumento em quase todos os experimentos com adição da ESCUMA bruta. Este aumento pode ser atribuído à ação de bactérias hidrolíticas presentes no lodo, que contribuíram para a solubilização do material particulado das misturas, associada ao baixo consumo de substrato devido à baixa atividade dos micro-organismos. Nos experimentos com ESCUMA hidrolisada, à exceção da adição de 1% e 10%, obteve-se maiores remoções de DQO solúvel. A maior remoção deste parâmetro foi 86% quando se adicionou 50% de ESCUMA hidrolisada no esgoto. Novamente, uma explicação para este resultado seria o aumento da fração de matéria orgânica biodegradável na ESCUMA hidrolisada. Com isso, conclui-se que apesar da remoção de DQO total da ESCUMA bruta ser maior, os micro-organismos presentes no lodo foram capazes de assimilar melhor os ácidos livres liberados na hidrólise que os constituintes originais da ESCUMA bruta.

As Figuras 4.24 a 4.26 apresentam os perfis de produção de biogás durante os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia para as duas condições testadas, ESCUMA bruta e hidrolisada, sob diferentes concentrações no esgoto. A medida do biogás foi realizada a cada dia, até sua estabilização.

Em todas as concentrações de ESCUMA avaliadas, e até mesmo com esgoto bruto (mostrado na Figura 4.24 A), verificou-se uma fase lag (tempo gasto da inoculação até o início da produção de biogás) de 3,0 a 4,8 dias, independente da ESCUMA estar hidrolisada ou não. A fase lag foi calculada a partir do gráfico de produção de biogás ao longo do tempo, através da reta que representa a etapa de maior taxa de produção do mesmo. Dessa forma, o ponto desta reta que intercepta o eixo do tempo constitui o período da fase lag (Tabela com os valores no Apêndice - B). A produção de biogás estabilizou a partir do 6° dia, sem distinção entre os ensaios com ESCUMA bruta e hidrolisada.

Analisado as Figuras 4.24 a 4.26, com exceção de 1 e 10% de adição, todas as cinéticas mostraram que a ESCUMA hidrolisada apresentou maior produção acumulada de biogás. Cabe destacar os resultados observados na Figura 4.26 com ESCUMAS 100%, na qual se verificam durações da fase lag de 4,5 e 2,2 dias e velocidade máxima de produção de biogás de 2,0 e 6,0 mL/dia (no período avaliado) para a ESCUMA bruta e hidrolisada, respectivamente. Estes resultados comprovam o efeito favorável da etapa de pré-hidrólise enzimática na digestão anaeróbia.

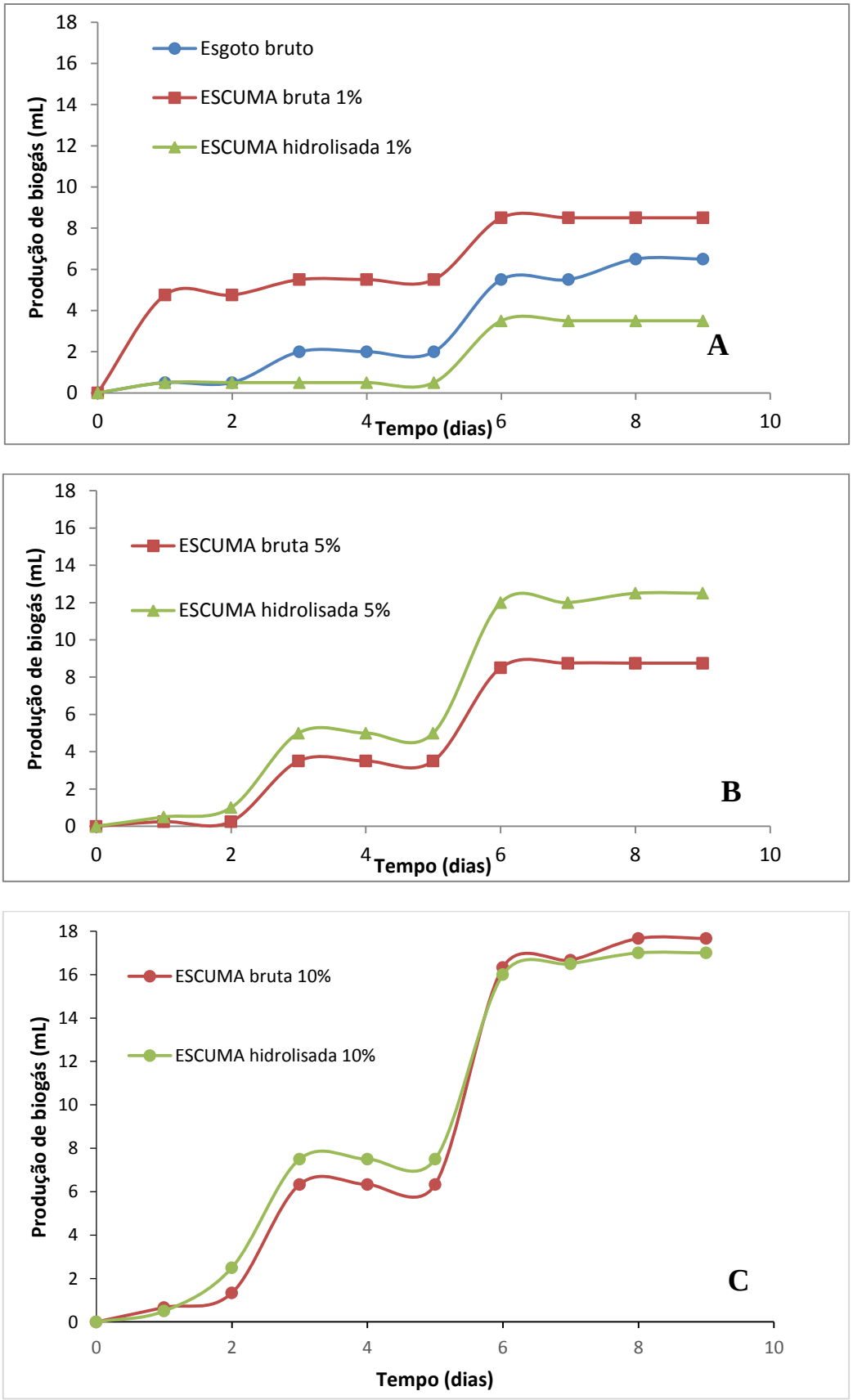
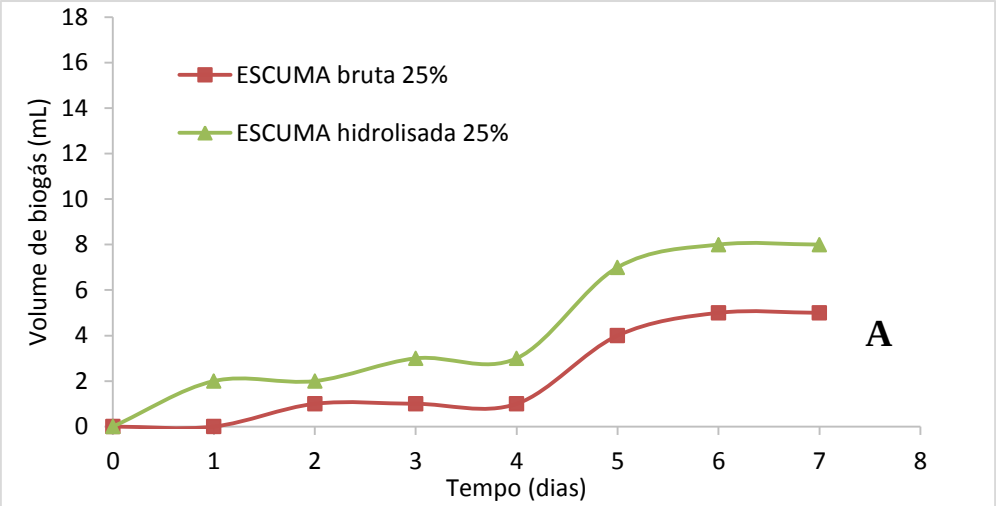
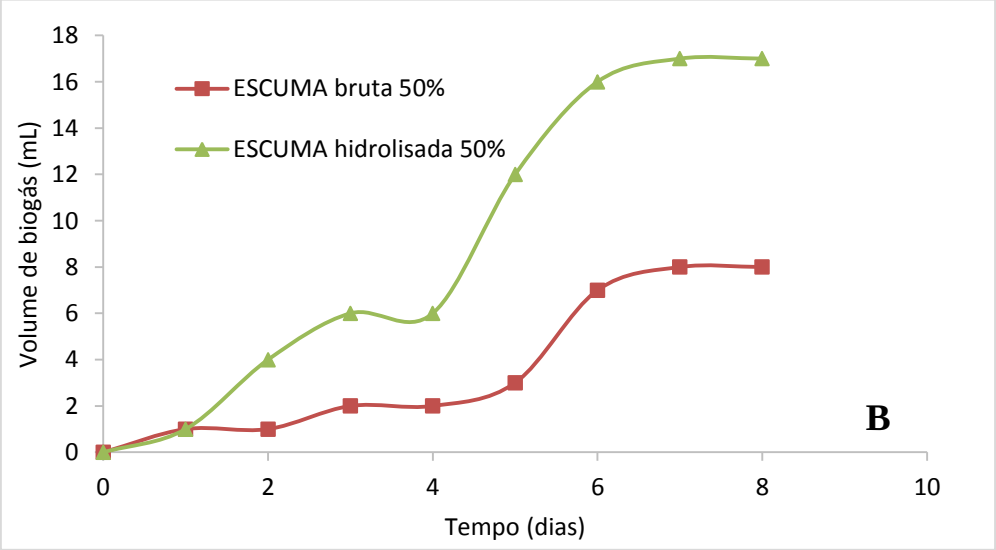


Figura 4.24 – Perfil de produção do biogás com adição de 1% (A), 5% (B) e 10% (C) da escuma bruta e hidrolisada no esgoto.





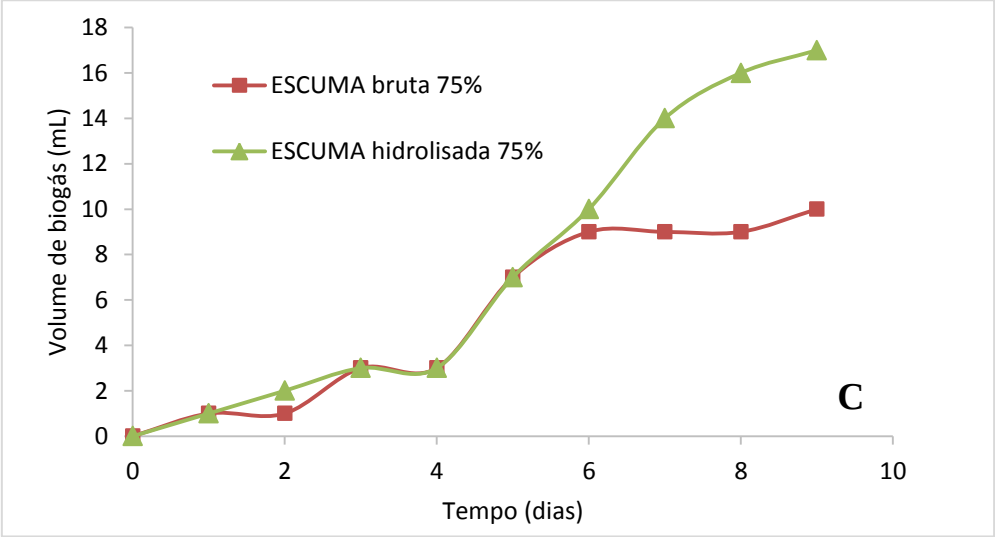


Figura 4.25 – Perfil de produção do biogás com adição de 25% (A), 50% (B) e 75% (C) da escuma bruta e hidrolisada no esgoto.

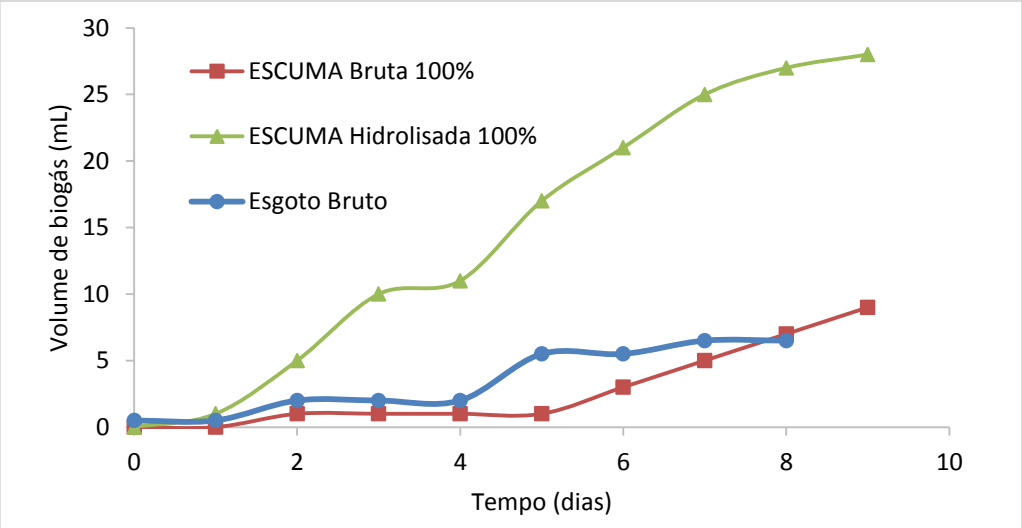


Figura 4.26 – Perfil de produção do biogás com adição de 100% da escuma bruta e hidrolisada no esgoto.

Santos (2014) avaliou o processo de pré-tratamento enzimático da escuma com diferentes concentrações de enzima e também obteve melhores produções de biogás com os efluentes pré-tratados enzimaticamente, quando comparados aos controles. A autora complementa que, apesar da composição química da escuma ser complexa e heterogênea, este resíduo é passível de ser biodegradado pelo consórcio microbiano presente no lodo anaeróbio.

Donoso-Bravo e Fdz-Polanco (2013) avaliaram a aplicação direta de lipases comerciais (BIOLIPASA L) em reatores anaeróbios contendo lodo de esgoto e diferentes concentrações de gordura, provenientes de caixa de gordura. Dois experimentos foram realizados pelos autores para avaliar: o efeito da adição da enzima e a sua dosagem. Para a avaliação do efeito da adição da enzima sobre os substratos três concentrações diferentes de gorduras foram estudadas: 2, 5 e 10 % (massa de gordura SV^{-1}alimentado), sendo fixada a dosagem de enzima (0,25 % v/v). Nesse ensaio a adição de enzima (com atividade enzimática de 50000 U/g) aumentou a produção total de metano em todas as concentrações de gordura estudadas, e a partir dos parâmetros cinéticos estimados os autores concluíram que a adição desta aumenta a biodegradabilidade do resíduo. No segundo experimento quatro concentrações de enzimas foram testadas: 0.25, 0.33, 0.83 e 1.67 (% v/v) em dois reatores em batelada, um somente com lodo e outro com lodo e gordura na concentração de 5 %. A adição da enzima sem a gordura, apenas com o lodo de esgoto, foi testada para avaliar o potencial efeito desta sobre a biodegradabilidade do lodo e sua contribuição para produção total

de metano. Há um efeito positivo da adição das enzimas na biodegradabilidade anaeróbia quando a gordura é adicionada. Em todos os experimentos a concentração de inóculo e substrato foi de 0,5 g SV substrato SV^{-1} lodo. Os melhores resultados alcançados nesse trabalho foram com adições de 0,33 e 0,83% (v/v) de enzima.

A Figura 4.27 apresenta o percentual de metano (%) no biogás nos ensaios com diferentes concentrações de ESCUMA bruta e hidrolisada. Analisando a Tabela 4.10 e a referida figura percebe-se que todas as amostras apresentaram porcentagens de metano superiores ao controle, esgoto bruto, com 23,4% (linha verde na figura). A condição ESCUMA 1% foi a que apresentou menores percentuais, com valores bem próximos ao controle.

Com exceção da ESCUMA hidrolisada 5%, todas as demais amostras hidrolisadas apresentaram concentrações de metano acima de 70%. Li, Champagne e Anderson (2011), avaliaram diferentes concentrações do resíduo (m/v) denominado FOG (Fat, Oil and Grease) alcançando porcentagens de metano de 79,4 e 60%com 0,35 e 0,7 g/mL de resíduo, respectivamente. Para concentrações maiores desse resíduo não houve produção de metano. O resultado obtido no trabalho citado assemelha-se ao encontrado neste estudo.

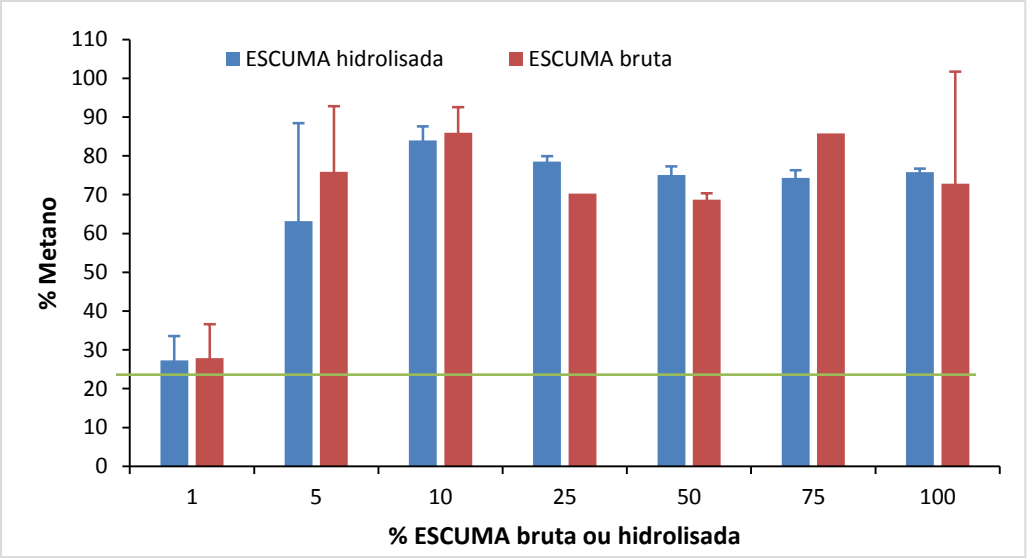


Figura 4.27 – Concentração de metano (%) no biogás produzido nas diferentes concentrações de escuma bruta e hidrolisada. Linha verde representa o % de metano no Controle (esgoto bruto).

A Figura 4.28 apresenta a Produção Específica de Metano (PEM) em relação a carga de DQO total aplicada, nas diferentes diluições de ESCUMA bruta e hidrolisada no esgoto. A PEM das ESCUMAS hidrolisadas foi maior que na ESCUMA bruta nas diluições de 5% e acima de 25%. Uma vez que a hidrólise promove a liberação de matériaorgânica de fácil assimilação pelos micro-organismos, a biodegradabilidade anaeróbia da escuma torna-se mais eficiente para formação do metano (DUARTE, 2013). Em comparação à PEM obtida para o esgoto bruto (controle – linha verde na figura) – 133,4 mL CH_4/g $DQO_{aplicada}$ – verifica-se melhores resultados com ESCUMA 5% e 10%. Com 1% e 25% ou mais ocorre efeito contrário ao esperado, com a adição de escuma prejudicando o tratamento anaeróbio.

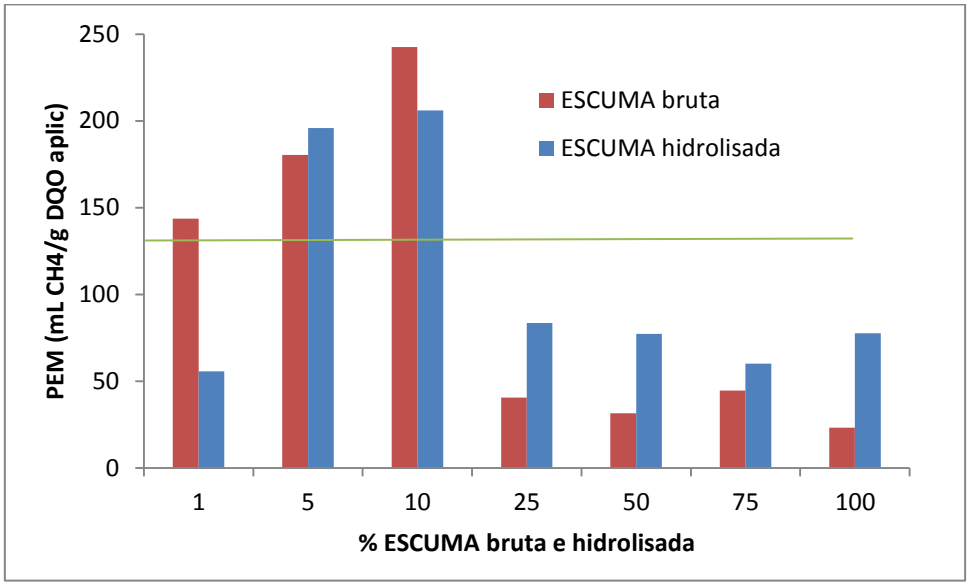


Figura 4.28 – Produção Específica de Metano (PEM) em relação à carga de DQO total aplicada, nas diferentes diluições de escuma bruta e hidrolisada no esgoto. Linha verde representa a PEM do Controle (esgoto bruto).

Analisando os dados de DQO final e PEM, concluiu-se que a diluição de 5% da ESCUMA hidrolisada seria a mais adequada para iniciar os experimentos de adição desta no esgoto afluente de reatores anaeróbios, pois permite maior produção de metano (quando comparada ao esgoto e ESCUMA bruta) sem prejudicar a DQO total final. Na Tabela 4.15 é apresentado um resumo dos resultados obtidos com esgoto bruto e com ESCUMA hidrolisada 5%.

Analisando todos os resultados obtidos nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia, conclui-se que a adição da ESCUMA hidrolisada permite boas remoções de DQO total, produção de biogás e metano, havendo um aumento de todas essas variáveis quando comparadas ao esgoto bruto. Além do mais, o pré-tratamento enzimático se mostra eficiente em termos de PEM, em comparação à adição da ESCUMA bruta, mostrando que a liberação dos ácidos livres na amostra não inibe as arqueas metanogênicas.

A diluição da ESCUMA hidrolisada na corrente de esgoto, antes da entrada no reator anaeróbio, mostra-se uma alternativa tecnicamente viável, pois permite o aumento da produção de metano no reator e é uma forma de tratamento e valoração da escuma gerada nas ETE, além de poder minimizar problemas operacionais decorrentes do acúmulo da mesma nos reatores.

Tabela 4.15 – Resumo dos resultados obtidos na digestão anaeróbia de esgoto bruto e 5% de escuma hidrolisada.

CONDIÇÃO	**ESGOTO BRUTO**	**5% ESCUMA HIDROLISADA**
Fase lag (d)	4,4	4,3
Vmáx (mL biogás/d)	3,5	7,0
T estabilização (d)	8	6
DQO total final (mg/L)	134 ± 13	138 ± 10
Remoção DQOt (%)	11,8 ± 8,3	76,6 ± 3,9
% CH_4 no biogás	23,4 ± 22,2	75,9 ± 16,9
PEM (mL CH_4/g DQO_{aplic})	133,4	195,8

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Resíduos gerados dentro de ETE apresentam potencial biotecnológico para:

- Isolamento de fungos filamentosos com potencial de produção de enzimas hidrolíticas;
- Utilização como substratos na FES de fungos filamentosos para produção de enzimas hidrolíticas.

As enzimas produzidas pelo fungo *Aspergillus terreus*, isolado do resíduo de ETE, foram capazes de hidrolisar diferentes concentrações de O&G presentes em mistura de escuma e esgoto, aumentando de 7 a 12 vezes a carga de DQO aplicada em um reator anaeróbio (considerando somente a fração solúvel).

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia permitiram concluir que os ácidos livres, liberados pela enzima na etapa de pré-hidrólise, foram consumidos pelo consórcio microbiano presente no lodo anaeróbio, uma vez que ocorreu uma considerável remoção de DQO solúvel na mistura hidrolisada, em comparação com a bruta. Com isso, mostrou-se neste trabalho que uma etapa de pré-hidrólise dos O&G presentes na escuma com enzimas é importante para biodisponibilizar os ácidos livres e glicerol para os micro-organismos do lodo anaeróbio. E que a diluição da escuma hidrolisada na corrente do esgoto, antes da entrada no reator anaeróbio, é uma alternativa tecnicamente viável para o tratamento e valoração deste resíduo nas ETE.

A diluição de 5% da mistura hidrolisada seria a mais adequada para iniciar os experimentos de adição de escuma hidrolisada no esgoto afluente de reatores anaeróbios, pois permite maior produção de metano (quando comparada ao esgoto e mistura bruta) sem prejudicar a DQO total final. Portanto, conclui-se que apesar da remoção de DQO total da mistura bruta ser maior, os micro-organismos presentes no lodo foram capazes de assimilar melhor os ácidos livres liberados na hidrólise que os constituintes originais da mistura bruta.

5.2 SUGESTÕES

As sugestões para trabalhos futuros seriam:

- Otimização da FES para o fungo *Aspergillus terreus*, em relação à mistura dos resíduos, umidade e temperatura, empregando planejamento experimental baseando-se nos trabalhos descritos na literatura para este fungo.
- Caracterização da enzima quanto ao substrato, pH e temperatura. Utilizar, na caracterização da enzima quanto ao substrato, azeite de oliva e a escuma gerada no UASB.
- Avaliar a hidrólise enzimática, utilizando a técnica de planejamento de experimentos, em relação à temperatura da reação, agitação, pH e quantidade de enzima adicionada. Uma comparação entre uma enzima comercial e a obtida neste trabalho também seria interessante.
- Estudo do tratamento anaeróbio do PES decantado na etapa de hidrólise da escuma.
- Avaliar a etapa de pré hidrólise em dois biorreatores UASB de bancada, sendo um controle (sem a etapa de hidrólise), empregando o lodo anaeróbio da própria ETE. Uma alimentação continua deveria ser estudada a fim de avaliar o efeito da pré hidrólise tanto no lodo quanto na formação de escuma no topo do reator.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE INGREDIENTES E ADITIVOS PARA ALIMENTOS. **Enzimas na fabricação de alimentos.** Disponível em: < http://www.abiam.com.br/workshop-abiam/item/18-enzimas-na-fabricac-a-o-de-alimentos>. Acesso em: 01. dez. 2015.

AIYUK, S. et al. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates-a review. **Bioresource Technology,** v.97, n.17, p. 2225–41, 2006.

ALEXANDRE, V. M. F. et al. Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolyzed with a solid enzyme pool. **Renewable Energy,** v. 36, n. 12, p. 3439–3444, 2011.

ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. **Lodo de esgotos:** tratamento e disposição final. Belo Horizonte: DESA-UFMG/SANEPAR, 2001. 484 p.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 20st ed. Washington: 1999.

_____. **Standard methods for the examination of water and wastewater.**21st ed. Washington: 2005.

BARATTO, C.M. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência,** v. 11, p. 15-28, 2011.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: A review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 881–896, 2003.

BHUMIBHAMON, O.; PHATTAYAKORN, K. Lipase-producing microorganisms for use in contaminated fat and oil kitchen wastewater treatment. **The Kasetsart Journal**, v. 37, n. 3, p. 327-333, 2003.

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

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

BRASIL. Congresso. Senado. **Projeto de Lei do Senado n° 425, de 2 de agosto de 2014.**Altera a Lei nº 12.305/10, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível em: <http://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/119536>. Acesso em: Acesso em: 02. fev. 2016.

_____. **Decreto n° 7.217, de 21 de junho de 2010.** Regulamenta a Lei nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007, que estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/decreto/D7217.htm>. Acesso em: 12. nov. 2015.

_____. Lei n° 11.445, de 5 de janeiro de 2007. Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico; altera as Leis nos 6.766, de 19 de dezembro de 1979, 8.036, de 11 de maio de 1990, 8.666, de 21 de junho de 1993, 8.987, de 13 de fevereiro de 1995; revoga a Lei no 6.528, de 11 de maio de 1978; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,** Brasília, 08. jan. 2007. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/l11445.htm>. Acesso em: 12. nov. 2015.

_____. Lei n° 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil,** Brasília, 03. ago. 2010. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm>. Acesso em: 02. fev. 2016.

_____. Ministério das Cidades. **Plano Nacional de Saneamento Básico.** Disponível em: <http://bibspi.planejamento.gov.br/bitstream/handle/iditem/437/Plano%20Nacional%20de%20Saneamento%20B%C3%A1sico_06-12-2013.pdf?sequence=1>. Acesso em: 02. fev. 2016.

_____. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n° 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: < http://www.mma.gov.br/port/conama/lebre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 12. nov. 2015.

BUENO, P. R. M. **Isolamento, seleção e cultivo de bactérias produtoras de lipases para tratamento de efluentes de indústria de alimentos.**2012. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciencias Agrárias - Agronomia) - Universidade Federal de Goiás,

Goiânia, 2012.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia Básica.** Recife: EDUFRPE, 2010. 110 p.

CARVALHO, P. D. O. et al. Kinetic properties and enantioselectivity of the lipases produced by four *Aspergillus* species. **Food Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 183–192, 2005.

CAVALCANTI, M. A. D. Q. et al. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 831–837, 2006.

CESAN - COMPANHIA ESPÍRITO SANTENSE DE SANEAMENTO. **Apostila Tratamento de Esgoto**. Disponível em:<http://www.cesan.com.br/wp-content/uploads/2013/08/ APOSTILA_TRATAMENTO_ESGOTO.pdf>. Acesso em: 01. Dez. 2015.

CETESB - COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Sólidos: Métodos de Ensaio**. São Paulo: SABESP, jun. 1999. (Norma técnica interna SABESP, NTS 013 Revisão 1).

CHAN, Y. J., CHONG, M. F., LAW, C. L., HASSELL, D. G. A review on anaerobic–aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v.155, n. 1-2, p. 1–18, 2009.

CHATURVEDI, M. et al. Isolation of lipase producing bacteria from oil contaminated soil for the production of Lipase by solid state fermentation using coconut oil cake. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, n. 4, p. 585–594, 2010.

CHEN, Y., XIAO, B., CHANG, J., Fu, Y., LV, P., & WANG, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 3, p. 668-673, 2009.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios**. 2. ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 2007. 5 v.

CHIABAI, R.; REBOUÇAS, C. C.; GONÇALVES, R. F. Esgoto sanitário associando reatores anaeróbios e aeróbios, In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. 23., 2005, Campo Grande. **Anais eletrônicos**... Campo Grande, UFMS, 2005. Disponível em: <http://www.abes.locaweb.com.br/XP/XP-EasyEventos/Site/XP-PortalPaginaShow.php?id=218> Acesso em: 01. Dez. 2015.

COIMBRA, M. C. et al. Seleção de fungos isolados do ambiente com atividade lipolítica. **Revista do Instituto Adolf Lutz,** v. 71, n. 1, p. 50–55, 2012.

CONTESINI, F. J. et al. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 67, n. 3-4, p. 163–171, 2010.

CURITIBA. Lei nº 13.634, 25 de novembro de 2010. Acresce o § 3º ao art. 144 da lei 11.095, de 21 de julho de 2004. **Diário oficial [do] município de Curitiba,** Curitiba, 09. dez. 2010. Disponível em: <https://leismunicipais.com.br/a/pr/c/curitiba/lei-ordinaria/2010/1363/13634/lei-ordinaria-n-13634-2010-acresce-o-3-ao-art-144-da-lei11 0 95-de-21-de-julho-de-2004>. Acesso em: 12. nov. 2015.

DEZOTTI, M. **Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes domésticos.**Rio de Janeiro: E-papers, 2008. 360 p.

DONOSO-BRAVO, A.; FDZ-POLANCO, M. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and grease trap: Assessment of enzyme addition. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5-6, p. 936–940, 2013.

DUARTE, J. G. **Hidrólise Enzimática e Digestão Anaeróbia Termofílica de Efluente de Indústria de Pescado.** 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

DUARTE, J. G. et al. Enzymatic hydrolysis and anaerobic biological treatment of fish industry effluent: Evaluation of the mesophilic and thermophilic conditions. **Renewable Energy**, v. 83, p. 455–462, 2015.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ENZILIMP. **Enzilimp.** Disponível em: http://www.enzilimp.com.br/site. Acesso em: 16. jan. 2016.

FACCHIN, S. **Isolamento de microrganismos e seleção de enzimas microbianas com aplicações biotecnológicas no tratamento de esgotos.** 2013. 74 f. Tese (programa de Pós-Graduação em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FREIRE, D. M. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter : effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **AppliedBiochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 409–421, 1997.

FREIRE, D. M. **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*.** 1996. 174 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623–7629, 2008.

GARCÍA-GEN, S. et al. Kinetic modeling of anaerobic hydrolysis of solid wastes, including disintegration processes. **Waste Management (New York, N.Y.)**, v. 35, n. 1, p. 96–104, 2015.

GARCÍA-GEN, S.; RODRÍGUEZ, J.; LEMA, J. M Control strategy for maximum anaerobic co-digestion performance. **Water Research**, v. 80, p. 209–216, 2015.

_____. Optimization of substrate blends in anaerobic co-digestion using adaptive linear programming. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 159–167, 2014.

GEA, T. et al. Co-composting of sewage sludge:fats mixtures and characteristics of the lipases involved. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, n. 3, p. 275–283, 2007.

GERARDI, M. H. **The microbiology of anaerobic digesters.** New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.

GHS CHEMICAL. **Biotecnologia de caixa de gordura**. Disponível em: http://www.ghsbrasil.com/empresa.asp. Acesso em: 16. jan. 2016.

GODOY, M.G.**Produção de lipase microbiana e destoxificaçãosimultânea de rejeitos agroindustriais.**2009. 116 f. Dissertação (Mestrado) - UniversidadeFederal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,2009.

GODOY, M.G. et al. Adding value to a toxic residue from thebiodiesel industry: production of two distinct pool of lipases fromPenicillium simplicissimum in castor bean waste. **Journal of IndustrialMicrobiology & Biotechnology**, v. 38, p. 945–953, 2011.

GOMBERT, A. K. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1-2, p. 85–90, 1999.

GRANT, W. D.; LONG, P. E. **Microbiologia ambiental.**Zaragoza: Ed. Acribia, 1989.

GRIEBELER, N. et al. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 4, p. 578–586, 2011.

GUIMARÃES, L. C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos.** 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

GULATI, R. et al. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 5, p. 459–464, 1999.

GUO, J. et al.. Effects of thermal pre-treatment on anaerobic co-digestion of municipal biowastes at high organic loading rate. **Chemosphere,** v. 101, n. 0, p. 66–70, 2014.

HAMDY, H. S.; ABO-TAHON, M. A. Extracellular lipase of *Aspergillus terreus* var. africanus (CBS 130.55): production, purification and characterization. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1723–1736, 2012.

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

HE, X. et al. Biodegradation of fat, oil and grease (FOG) deposits under various redox conditions relevant to sewer environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 14, p. 6059–68, p. 2015.

JABŁOŃSKI, S. J. et al. Continuous mesophilic anaerobic digestion of manure and rape oilcake – Experimental and modeling study. **Waste Management**, v. 35, p. 105–110, 2015.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu Rev Microbiol**, v. 53, p. 315–351, 1999.

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

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

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

JUNQUEIRA, W. B. C. **Desempenho de caixa de gordura empregada no tratamento preliminar dos efluentes de restaurante universitário.** 2014. 218 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

KEENER, K.M.; DUCOSTE, J.J.; HOLT, L.M. Properties influencing fat, oil, and grease deposit formation. **Water Environ. Res**. v. 80, n. 12, p. 2241-6, 2008.

KUMAR, S. et al. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource Technology,** v. 102, n. 7, p. 4909–4912, 2011.

LAUWERS, J. et al. Mathematical modeling of anaerobic digestion of biomass and waste: Power and limitations. **Progress in Energy and Combustion Science,** v. 39, n. 4, p. 383–402. 2013.

LEAL, M. C. M. R. et al. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry,** v. 41, n. 5, p. 1173–1178, 2006.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Servier, 2006.

LI, C.; CHAMPAGNE, P.; ANDERSON, B. C. Evaluating and modeling biogas production from municipal fat, oil, and grease and synthetic kitchen waste in anaerobic co-digestions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9471–9480, 2011.

LI, N.; ZONG, M. H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 43–54, 2010.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Blucher. 2002. 3 v.

LOPERENA, L. et al. Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 5, p. 1762–6, 2009.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos de azeites de oliva e de folhas de oliveira. **Alim. Nutr.**, v. 23, n. 4 , p. 537-548, 2012.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. **Biochemical Engineering Journal,** v. 32, n. 3, p. 185–190, 2006.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnol Annu. Rev.,** v. 8, p. 183-225, 2002.

MOBARAK-QAMSARI, E. et al. Enzymatic pre-hydrolysis of high fat content dairy wastewater as a pretreatment for anaerobic digestion. International **Journal of Environmental Research,** v. 6, n. 2, p. 475–480, 2012.

NAKHLA, G. et al. Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater. **Journal of Hazardous Materials,** v. 102, n. 2-3, p. 243–255, 2003.

NISOLA, G. M. et al. Cell Immobilized FOG-Trap System for Fat, Oil, and Grease Removal from Restaurant Wastewater. **Journal of Environmental Engineering**, v. 135, n. 9, p. 876–884, 2009.

NUVOLARI, A. et al. **Esgoto sanitário:** Coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2011.

OLIVEIRA, J. P. et al. Caracterização físico-química de resíduos oleosos do saneamento e dos óleos e graxas extraídos visando a conversão em biocombustíveis. **Química Nova,** v. 37, n. 4, p. 597–602, 2014.

ORDONEZ, J. **Tecnologia de alimentos.**Componentes dos alimentos e processos. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2005. 1 v.

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

PASTORE, G. M.; BICAS, J. L.; JÚNIOR, M. R. M. **Biotecnologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2013. 12 v.

PEIXOTO, A. V. **Estudo da codisposição de resíduos de fossas e tanques sépticos, com e sem a remoção prévia de gordura, no desempenho de tratamento de esgoto com reatores UASB.** 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia:** conceitos e aplicações. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1997. 556 p.

PEREIRA, M. G. et al. Screening of filamentous fungi for lipase production: Hypocrea pseudokoningii a new producer with a high biotechnological potential. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 74–83, 2014.

PEREIRA, E. L.; CAMPOS, C. M. M.; MOTERANI, F. Efeitos do pH, acidez e alcalinidade na microbiota de um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) tratando efluentes de suinocultura. **Revista Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 4, n. 3, p. 157–168, 2009.

PINTO, G. A. S. et al. **Fermentação em estado sólido**: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Fortaleza: EMBRAPA, ago. 2005 (Comunicado técnico da Embrapa, n. 102).

PONTES, P. P. **Reatores UASB aplicados ao tratamento combinado de esgotos sanitários e lodo excedente de filtro biológico percolador.** 2003. 175 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

QUEISSADA, D. D. **Isolamento e seleção de microrganismos para remediação de efluente oleoso da indústria metal-mecânica.** 2009. 121 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia industrial. Área de concentração: conversão de Biomassa) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

RAJAN, A.; NAIR, A. J. A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated Aspergillus fumigatus MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 569–574, 2011.

REINEHR, C. O. et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.

RIGO, E. et al. Preliminary characterization of novel extra-cellular lipase from *Penicillium crustosum* under solid-state fermentation and its potential application for triglycerides hydrolysis. **Food and Bioprocess Technology,** v. 5, p. 1592–1600, 2012.

RIO DE JANEIRO (RJ). Lei nº 4.991, de 22 de janeiro de 2009. Dispõe sobre a obrigatoriedade da limpeza das caixas de gordura nas edificações do Município do Rio de Janeiro. **Diário Oficial [do] Município do Rio de Janeiro,** Rio de Janeiro, 23. jan. 2009. Disponível em: < http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/3372233/DLFE-262209.pdf/LEIMUNICIPALN4..9.9.1.DE2.2.DEJANEIRODE2.0.0.9..pdf>. Acesso em: 12. nov. 2015.

ROCHA, D. C. et al. Selection of microorganismsproducer of lipase for fat removal from biodiesel purification water. **Eng. Agric. Jaboticabal**, v. 33, n. 2, p. 332-340, 2013.

ROMAN, H. J.; BURGUESS, J. E.; PLETSCHKE, B. I. Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 963-967, 2006.

SANGALETTI-GERHARD, N. et al. In situ biodiesel production from greasy sewage sludge using acid and enzymatic catalysts. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 63–70, 2015.

SANTOS, A. **Remoção, tratamento e valoração de escuma proveniente de reatores UASB aplicados ao tratamento de esgoto doméstico**. 2014. 116 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2014.

SANTOS, A. S. P. **Aspectos técnicos e econômicos do tratamento combinado de lixiviado de aterro sanitário com esgoto doméstico em lagoas de estabilização.** 2010. 212 f. Tese (Doutorado em engenharia civil) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

SATO, K.; SUDO, S. Small-Scale Solid-State Fermentations. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**, v. 6, p. 60-79.

SERRANO, A. et al. Agri-food waste valorization through anaerobic co-digestion: Fish and strawberry residues. **Journal of Cleaner Production,** v. 54, p. 125–132, 2013.

SETHI, B. K. et al. Lipase production by *Aspergillus terreus* using mustard seed oil cake as a carbon source. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 241–252, 2013.

SHANGGUAN, J.-J. et al. Expression and characterization of a novel lipase from *Aspergillus fumigatus* with high specific activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 949–62, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances,** v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SHI, H. et al. Purification and characterization of a hydrolysis-resistant lipase from *Aspergillus terreus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 165–174, 2014.

SILVA, J. N. **Produção de lipase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Rhizomucor miehei*.** 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SOARES, C. A. L. **SMEL - sistema de mistura de escuma e lodo**. BR 10 2013 033447 2, 2013. 1 p.

SOARES, S. R. A.; MATOS, Z. M. R.; BERNARDES, R. S. Modelagem do processo de desidratação de lodo anaeróbio em leitos de secagem simulados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 2, p. 313–319, 2001.

SPERB, J. G. C. et al. Lipases e biossurfactantes por fungos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385–397, 2015.

SUNADA, N. **Co-digestão dos dejetos de suínos e óleo vegetal de descarte: Adição de microrganismos e lipases comerciais**. 2015. 59 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, São Paulo, 2015.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial.** Engenharia Bioquímica. São Paulo: Blucher. 2001. 2 v.

SOUZA, C. L. et al. Production and characterization of scum and its role in odour control in UASB reactors treating domestic wastewater. **Water Science Technology**, v. 54, n. 9, p. 201-208, 2006.

TAKENO, K.; YAMAOKA, Y.; SASAKI, K. Treatment of oil-containing sewage wastewater using immobilized photosynthetic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1385–1391, 2005.

TCHOBANOGLOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. **Wastewater Engineering:** Treatment, disposal and reuse. 3. ed. Singapore: McGraw-Hill, 1991.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

TZIRITA, M. **A characterization of bioaugmentation products for the treatment of waste fats, oils and grease (FOG).** 2012. 237 f. Thesis (PhD) - Dublin City University. Dublin, 2012.

VALENTE, A. M. et al. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 483–488, 2010.

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

VAN HAANDEL, A.; LETTINGA, G. **Tratamento anaeróbio de esgoto**. Um manual para regiões de clima quente. Campina Grande: Epigraf, 1994. 240 p.

VARGAS, G.D.L.P. et al. Optimization of lipase production by Penicillium simplicissimum in soybean meal. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, p. 47 – 54, 2008.

VERSIANI, B. M. **Desempenho de um reator UASB submetido a diferentescondições operacionais tratando esgotos sanitários do campus da UFRJ**. 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em engenharia civil) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias.** Lodos Ativados. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1997. 4 v.

_____. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3. ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 2005. 1 v.

_____. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias.** Princípios básicos do tratamento de esgotos. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1996. 2 v.

WILLIAMS, J. B. et al. Fat, oil and grease deposits in sewers: Characterization of deposits and formation mechanisms. **Water Research**, v. 46, n. 19, p. 6319–6328, 2012.

APÊNDICE – A

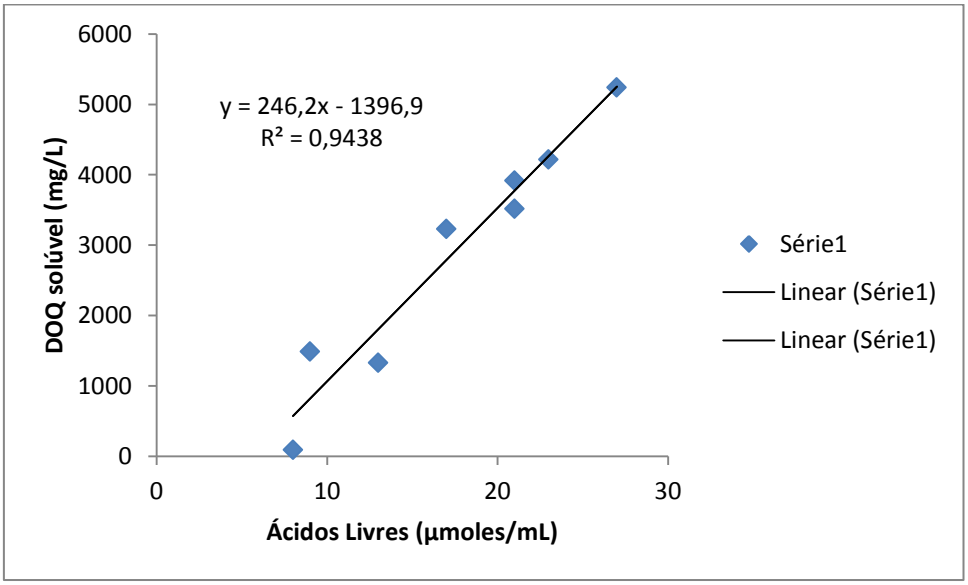


Figura A.1 - Correlação obtida entre a concentração de DQO solúvel e Ácidos Livres no teste de hidrólise.

APÊNDICE – B

Tabela B.1 – Valores da fase Lag (dias), Velocidade Máxima de produção de Biogás e tempo de estabilização das misturas brutas e hidrolisadas, bem como o esgoto bruto.

MISTURA	Fase Lag (d)	Vm(mL/d)	t estab (d)
Esgoto	4,4	3,5	8
Bruta 1%	3,2	4,75	6
Hidro 1%	4,8	3	6
Bruta 5%	4,3	5	6
Hidro 5%	4,3	7	6
Bruta 10%	4,4	10	8
Hidro 10%	4,1	8,5	8
Bruta 25%	3,7	3,0	6
Hidro 25%	3,3	4,0	6
Bruta 50%	4,3	4,0	7
Hidro 50%	3,0	6,0	7
Bruta 75%	3,3	4,0	>9
Hidro 75%	3,2	3,7	>9
Bruta 100%	4,5	2,0	>9
Hidro 100%	2,2	6,0	>9