UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

FERNANDA RIBEIRO DO CARMO DAMASCENO

APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO E BIOSSURFATANTE NO TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTE COM ALTO TEOR DE GORDURA

RIO DE JANEIRO
2013

Fernanda Ribeiro do Carmo Damasceno

APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO E BIOSSURFATANTE NO TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTE COM ALTO TEOR DE GORDURA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Magali Christe Cammarota
Denise Maria Guimarães Freire

Rio de Janeiro
2013

APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO E BIOSSURFATANTE NO TRATAMENTO ANAERÓBIO DE EFLUENTE COM ALTO TEOR DE GORDURA

Fernanda Ribeiro do Carmo Damasceno

Orientadores: Magali Christe Cammarota e Denise Maria Guimarães Freire

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada por:

Magali Christe Cammarota (Orientadora)
D.Sc., UFRJ

Denise Maria Guimarães Freire (Orientadora)
D.Sc., UFRJ

Marcelo Zaiat
D.Sc., USP

Viridiana Santana Ferreira Leitão
D.Sc., INT

Isaac Volchan Júnior
D.Sc., UFRJ

Eliana Flávia Camporese Sérvulo
D.Sc., UFRJ

Maria Alice Zarur Coelho
D.Sc., UFRJ

Rio de Janeiro

Maio, 2013

Damasceno, Fernanda Ribeiro do Carmo

Aplicação de preparado enzimático e biossurfatante no tratamento anaeróbio de efluente com alto teor de gordura/ Fernanda Ribeiro do Carmo Damasceno. Rio de Janeiro: UFRJ/Escola de Química, 2013.

178 f

Orientadores: Magali Christe Cammarota

Denise Maria Guimarães Freire

Tese (doutorado)- UFRJ/Escola de Química/Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2013.

Referências Bibliográficas: f. 158-178

1. Efluente 2. Abate de Aves 3. Enzimas 4. Biossurfatante 5. Tratamento Anaeróbio I Damasceno, Fernanda Ribeiro do Carmo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química/Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. III. Aplicação de preparado enzimático e biossurfatante no tratamento anaeróbio de efluente com alto teor de gordura.

Agradecimentos

À Deus, rico em misericórdia, por atender todas minhas necessidades e não minhas vontades, agradeço imensamente.

À professora Magali C. Cammarota, pela orientação, interesse, disponibilidade, auxílio e principalmente por sua paciência diante de minhas limitações, muito obrigada!

À professora Denise M. G. Freire, pelas sugestões, apoio, interesse, generosidade e principalmente pela motivação utilizando sábias palavras quando mais precisei. Não teria conseguido sem escutar e praticar suas palavras "…. trabalhe e trabalhe, nada supera o trabalho…." talvez não saiba, mais isto foi de extrema importância, portanto não tenho palavras para agradecer!

A todos meus familiares: pai, mãe, irmãs, sogro, sogra, cunhados e sobrinhos, que se alegram com minhas vitórias, obrigada.

A todos os amigos do Laboratório de Tecnologia Ambiental: Claudia, Tayane, João, Lu, Jaque, Juliana, Nathalia e Luciano, pelos momentos de descontração, obrigada…. em especial a: Suzana Morais Oliveira, pela sua disponibilidade em ajudar sempre e por sua amizade, muiiiito obrigada e a Verônica Marinho Fontes Alexandre, pelas inúmeras vezes que me ajudou, principalmente com cálculos químicos e análises experimentais, se fosse representar por palavras muita gratidão, escreveria outra tese….agradeço imensamente!

Aos alunos de iniciação científica que ajudaram na parte experimental deste trabalho: Monique, Larissa, Juliana, Hugo, Michelle e Lucas, obrigada por me ensinar a ensinar.

A todos do LABIM: Aline, Val, Tais, Roberta, Bruno, Joab, Mariana e Mel por manterem um ambiente alegre, em especial à Lívia e ao Antônio pela disponibilidade, por partilharem comigo todo conhecimento para obtenção do biossurfatante, muito obrigada. Ao Mateus Godoy por toda ajuda com a estatística, a Jaque Nascimento pelo apoio na obtenção dos *pools* enzimáticos e à Elisa Cavalcante pela ajuda com a análise econômica, o meu sincero agradecimento.

Ao Vitor Liduino, à professora Eliana Flávia e à Dra Marcia Teresa Soares Lutterbach, pelo auxílio com as análises de biologia molecular, muito obrigada.

Aos responsáveis pela ETE da indústria Reginaves Indústria e Comércio Ltda., por permitirem acesso às instalações e fornecimento do efluente e lodo anaeróbio para realização deste trabalho.

De um modo todo especial agradeço aos meus grandes amores: meu esposo Ricardo e minha filha Giovana, por compreenderem minha ausência, me darem forças sempre.... Esta tese é de vocês! AMO MUITO !!!

RESUMO

DAMASCENO, Fernanda Ribeiro do Carmo. Aplicação de preparado enzimático e biossurfatante no tratamento anaeróbio de efluente com alto teor de gordura. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A produção de lipases e proteases por fermentação em estado sólido com os fungos *Penicillium simplicissimum*, *P. verrucosum* e *P. brevicompactum* foi avaliada empregando-se torta de babaçu como meio de cultura. As atividades lipásica e proteásica médias dos *pools* enzimáticos produzidos por *P. brevicompactum* e *P. simplicissimum* foram de 49 e 3 U/g, e 9 e 26 U/g, respectivamente. O biossurfatante do tipo ramnolipídeo foi produzido por fermentação submersa com *Pseudomonas aeruginosa* obtendo-se, após 168 h, uma concentração micelar crítica (CMC) de 48 a 118 mg ramnolipídeo/L. Em concentrações abaixo da CMC este não interferiu na atividade lipásica dos *pools* enzimáticos; já em concentrações acima da CMC houve reduções de 70-74% da atividade lipásica. A aplicação conjunta do biossurfatante e *pools* enzimáticos foi avaliada em etapa anterior ao tratamento biológico anaeróbio de efluente de indústria de abate de aves contendo alto teor de gordura. Os *pools*, em concentrações variando de 0,1 a 1,14% (m/v), bem como o biossurfatante em concentrações abaixo e acima da CMC, foram avaliados em relação à toxicidade, solubilização da demanda química de oxigênio (DQO) e biodegradabilidade anaeróbia. A combinação de 0,5% (m/v) de *pool* enzimático produzido por *P. brevicompactum* e 27 mg/L (abaixo da CMC) de biossurfatante foi a que resultou em maiores produções específicas de metano e menor acúmulo de gordura na biomassa, sendo selecionada para a etapa de pré-tratamento do efluente em biorreatores anaeróbios de manta de lodo (UASB –*upflow anaerobic sludge blanket*) de bancada. Um biorreator foi alimentado com o efluente sem tratamento (Controle) e o outro com o efluente pré-tratado (Teste). Ambos tinham 1,08 L de volume útil e operaram sob cargas orgânicas volumétricas de 6 e 11 kg DQO/m^3.d, no 1º e 2º regimes, respectivamente. O reator Teste apresentou maiores produções de metano (32,2 L e 39,7 L), remoções de DQO (90,2% e 91,2%) e óleos e graxas (96,0% e 95,8%), no 1º e 2º regimes, quando comparado ao reator Controle, que produziu 23,1 L e 18,2 L de metano, apresentou 89,1% e 72,5% de remoção de DQO e 87% e 48% de remoção de óleos e graxas, no 1º e 2º regimes, respectivamente. O reator Controle apresentou cinco episódios de entupimentos devido ao acúmulo de gordura na superfície, enquanto o reator Teste operou

durante 187 dias sem problemas operacionais. Ao final de cada regime, os reatores foram abertos para limpeza e caracterização da escuma e do lodo anaeróbio. A escuma do Controle continha 1642 e 10548 mg O&G/L e a do Teste 155 e 904 mg O&G/L, no 1º e 2º regimes, respectivamente. O acúmulo de gordura no Controle foi, no mínimo, 4,6 vezes maior que no Teste. O Controle também apresentou maior acúmulo de gordura no lodo anaeróbio, sendo 4 e 6 vezes maior que no Teste no 1º e 2º regimes.

Palavras-chave: efluente, abatedouro, enzimas, biossurfatante, reator UASB

ABSTRACT

DAMASCENO, Fernanda Ribeiro do Carmo. Application of enzyme preparation and biosurfactant in the anaerobic treatment of effluent with high fat content. Rio de Janeiro, 2013. Thesis (Doctor in Sciences). School of Chemistry. Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

The production of lipases and proteases by solid-state fermentation with fungi *Penicillium simplicissimum*, *P. verrucosum* and *P. brevicompactum* was evaluated, using babassu cake as culture medium. The average lipase and protease activities in the enzyme pools produced by *P. brevicompactum* and *P. simplicissimum* were 49 and 3 U/g and 9 and 26 U/g, respectively. The rhamnolipid-type biosurfactant was produced by submerged fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* to obtain, after 168 h, critical micelle concentration (CMC) of 48-118 rhamnolipid mg/L. At concentrations below CMC, it did not interfere with the lipase activity of the enzyme pools; however, at concentrations above CMC, there were reductions of 70-74% in the lipase activity. The combined application of biosurfactant and enzyme pools was evaluated in step previous to the anaerobic biological treatment of effluent from a poultry processing plant, containing high fat content. The pools, at concentrations ranging from 0.1 to 1.14% (w / v), and biosurfactant at concentrations below and above CMC, were evaluated for toxicity, solubilization of the chemical oxygen demand (COD) and anaerobic biodegradability. The combination of 0.5% (w/v) enzyme pool produced by *P. brevicompactum* and 27 mg/L (below CMC) of biosurfactant resulted in higher specific methane production and lower fat accumulation in the biomass, and was selected for the stage of effluent pretreatment in bench upflow anaerobic sludge blanket (UASB). One bioreactor was fed with effluent without treatment (Control) and the other with pretreated effluent (Test). Both had 1.08 L of useful volume and operated under volumetric organic loads of 6 and 11 kg COD/m^3.d on the 1st and 2nd regimes, respectively. The test reactor showed higher methane production (32.2 L and 39.7 L), COD removals of 90.2% and 91.2% and O & G removal of 96.0% and 95.8% in the 1st and 2nd regimes when compared to control reactor, which produced 23.1 L and 18.2 L of methane, 89.1% and 72.5% of COD removal and 87% and 48% of O & G removal in the 1st and 2nd regimes, respectively. The control reactor showed five episodes of clogging due to the accumulation of fat on the surface, while the test reactor operated for 187 days without operational problems. At the end of each regime, the reactors were opened for cleaning and characterization of anaerobic sludge and scum. The scum in the

control reactor had 1,642 and 10,548 mg O&G/L and in the test reactor, 155 and 904 mg O&G/L on the 1st and 2nd regimes, respectively. The fat accumulation in the control reactor was at least 4.6 times higher than in the test reactor. The control reactor also showed higher fat accumulation in the anaerobic sludge, being 4 and 6 times higher than in the test reactor on the 1st and 2nd regimes.

Key words: effluent, slaughterhouse, enzymes, biosurfactant, UASB reactor

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS** ... 21
1.1 INTRODUÇÃO ... 21
1.2 OBJETIVOS ... 23
2 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ... 25
2.1 EFLUENTES DE ABATEDOUROS: CARACTERÍSTICAS E TRATAMENTO ... 25
2.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO ANAERÓBIO ... 28
2.2.1 **Etapas da digestão anaeróbia** ... 28
2.2.2 **Tratamento anaeróbio de efluentes com alta concentração de gorduras** ... 30
2.2.3 **Tratamento de efluentes em reatores UASB** ... 34
2.3 ENZIMAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES ... 37
2.3.1 **Lipases** ... 38
2.3.2 **Fermentação em estado sólido** ... 41
2.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTO TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS UTILIZANDO ENZIMAS ... 42
2.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFATANTES E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES ... 46
2.5.1 **Surfatantes** ... 46
2.5.2 **Biossurfatante** ... 48
2.5.2.1 Ramnolipídeos ... 49
2.5.3 **Produção de biossurfatantes** ... 51
2.6 APLICAÇÃO DE BIOSSURFATANTES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES ... 52
2.7 APLICAÇÃO CONJUNTA DE ENZIMAS E BIOSSURFATANTES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES ... 53
2.8 ANÁLISE ECONÔMICA ... 55
2.8.1 **Escolha do software de apoio: SuperPro Designer** ... 55
3 **MATERIAIS E MÉTODOS** ... 57
3.1 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO TRABALHO ... 57
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS ... 58
3.2.1 **Atividade lipásica** ... 58
3.2.2 **Atividade proteásica** ... 59
3.2.3 **Índice de emulsificação** ... 59
3.2.4 **Tensão superficial e concentração micelar crítica** ... 60
3.2.5 **pH** ... 60
3.2.6 **Demanda química de oxigênio** ... 60
3.2.7 **Sólidos suspensos e dissolvidos, totais, fixos e voláteis** ... 61
3.2.8 **Concentração de sólidos nos reatores** ... 62

3.2.9 **Óleos & Graxas (O&G)** ... 63
3.2.10 **Nitrogênio total** ... 64
3.2.11 **Fósforo total** ... 64
3.2.12 **Alcalinidade total – Método Potenciométrico (Ripley et al., 1986)** ... 65
3.2.13 **Ácidos voláteis totais** ... 66
3.2.14 **Volume e composição do biogás** ... 67
3.2.15 **Atividade Metanogênica Específica (AME)** ... 68
3.2.16 **Análises moleculares para caracterização da diversidade microbiana** ... 69
3.2.16.1 Preservação das amostras e extração de DNA ... 69
3.2.16.2 Amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) ... 70
3.2.16.3 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) ... 71
3.2.16.4 Estatística do DGGE ... 71
4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO** ... 72
4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS *POOLS* ENZIMÁTICOS ... 72
4.1.1 **Micro-organismos: origem, manutenção e propagação** ... 72
4.1.2 **Produção dos *pools* enzimáticos** ... 72
4.1.3 **Resultados e discussão** ... 73
4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFATANTE ... 76
4.2.1 **Micro-organismo, pré-inóculo, inóculo e meios de cultivo** ... 76
4.2.2 **Produção de ramnolipídeo por fermentação submersa** ... 77
4.2.3 **Resultados e discussão** ... 77
4.3 INFLUÊNCIA DO BIOSSURFATANTE NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ... 80
4.3.1 **Determinação da atividade lipásica** ... 80
4.3.2 **Resultados e discussão** ... 81
4.4 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE E LODO ... 82
4.4.1 **Origem, coleta e caracterização do efluente** ... 82
4.4.2 **Origem, coleta e caracterização do lodo** ... 83
4.4.3 **Resultados e discussão** ... 83
4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DOS *POOLS* ENZIMÁTICOS BIOSSURFATANTE85
4.5.1 **Condução dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia** ... 86
4.5.2 **Resultados e discussão** ... 87
4.5.2.1 Efeito inibitório do *pool* enzimático produzido por *P. simplicissimum* ... 87
4.5.2.2 Efeito inibitório do *pool* enzimático produzido por *P.brevicompactum* ... 89
4.5.2.3 Efeito inibitório do biossurfatante ... 90
4.6 SOLUBILIZAÇÃO DO MATERIAL PARTICULADO NO EFLUENTE ... 91
4.6.1 **Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR)** ... 91

4.6.1.1 Primeiro planejamento: influência da concentração de biossurfatante e temperatura na solubilização da DQO 92

4.6.1.2 Segundo planejamento: ação combinada de biossurfatante, *pool* enzimático e temperatura na solubilização da DQO 93

4.6.1.3 Terceiro planejamento: ação combinada de biossurfatante e *pool* enzimático de *P. simplicissimum* na solubilização da DQO a 30ºC 93

4.6.2 **Resultados e discussão** 94

4.6.2.1 Influência da concentração de biossurfatante e temperatura na solubilização da DQO 94

4.6.2.2 Ação combinada de biossurfatante, *pool* enzimático e temperatura na solubilização da DQO 97

4.6.2.3 Ação combinada de biossurfatante e *pool* enzimático de *P. simplicissimum* na solubilização da DQO a 30ºC 101

4.6.2.4 Ação combinada de biossurfatante e *pool* enzimático de *P. brevicompactum* na solubilização da DQO a 30ºC 103

4.7 ENSAIOS PRELIMINARES DE BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA 106

4.7.1 **Procedimento experimental** 106

4.7.2 **Resultados e discussão** 107

4.7.2.1 Testes de biodegradabilidade anaeróbia após pré-tratamento com o *pool* de *P. simplicissimum* e biossurfatante 107

4.7.2.2 Testes de biodegradabilidade anaeróbia após pré-tratamento com o *pool* de *P. brevicompactum* e biossurfatante 109

4.8 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE COMBINANDO *POOLS* ENZIMÁTICOS E BIOSSURFATANTE 110

4.8.1 **Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR)** 110

4.8.2 **Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia** 112

4.8.3 **Resultados e discussão** 112

4.9 MONITORAMENTO DOS BIORREATORES ANAERÓBIOS 121

4.9.1 **Características e procedimento de operação dos reatores UASB de bancada** 122

4.9.2 **Resultados e discussão** 124

4.9.2.1 Carga Orgânica Volumétrica (COV) 124

4.9.2.2 pH, acidez volátil e alcalinidade 127

4.9.2.3 Demanda química de oxigênio 131

4.9.2.4 Óleos e graxas 134

4.9.2.5 Produção de biogás 137

4.9.2.6 Sólidos suspensos voláteis 140

4.9.2.7 Óleos e graxas na biomassa 140

4.9.2.8 Análise da diversidade microbiana 142

4.10 ANÁLISE ECONÔMICA 144

4.10.1 **Custo de implantação** 148

4.10.2 **Custos operacionais** 150

5 **CONCLUSÕES E SUGESTÕES** 156

5.1 CONCLUSÕES 156
5.2 SUGESTÕES 157
REFERÊNCIAS 158

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Etapas da digestão anaeróbia (adaptado de MCLNERNEY e BRYANT, 1981, *apud* SANT´ANNA JR, 2010). 29

Figura 2.2: Etapas da degradação anaeróbia de gorduras (GALLERT e WINTER, 2005). 32

Figura 2.3: Desenho esquemático do reator UASB (CHERNICHARO, 2007). 35

Figura 2.4: Hidrólise de triacilgliceróis pela ação de lipases (HARALDSSON, 1991)..... 39

Figura 2.5: Representação esquemática da estrutura de um surfatante. A – cabeça hidrofílica; B – cauda hidrofóbica (PEREIRA, 2011). 46

Figura 2.6: Representação da alocação dos surfatantes na superfície de um líquido polar (A) e no interior do líquido (B) (ZANA, 2005 *apud* CARA, 2009). 47

Figura 2.7: Representação esquemática da auto-agregação das moléculas de um surfatante (micela). Fonte: Pereira, 2011. 47

Figura 2.8: Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfatante (MULLIGAN, 2005 adaptado por CARA, 2009). 48

Figura 2.9: Representação esquemática da solubilização de compostos apolares no interior de micelas (CARA, 2009). 48

Figura 2.10: Estrutura química de mono-ramnolipídeo (a) e di-ramnolipídeo (b) (NGUYEN *et al*., 2008). 50

Figura 3.1: Fluxograma das etapas executadas durante o trabalho 57

Figura 4.1: Atividades lipásicas nos meios inoculados com os fungos *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum* e *P. verrucosum*, nos tempos de 48, 72 e 96 horas 74

Figura 4.2: Atividades proteásicas nos meios inoculados com os fungos *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum* e *P. verrucosum*, nos tempos de 48, 72 e 96 horas. 75

Figura 4.3: Determinação da Concentração Micelar Crítica, em função da tensão superficial, utilizando diluições sucessivas do caldo bruto da primeira, segunda e terceira fermentação utilizando *Pseudomonas aeruginosa* PA1. 79

Figura 4.4: Efeitos padronizados para o aumento máximo da DQO solúvel, com a concentração de biossurfatante e temperatura como variáveis independentes. 95

Figura 4.5: Superfície de resposta para o aumento máximo da $DQO_{Solúvel}$ em função da temperatura e concentração de biossurfatante. 96

Figura 4.6: Efeitos padronizados para o aumento máximo da DQO solúvel, utilizando biossurfatante, *pool* enzimático e temperatura como variáveis independentes. 98

Figura 4.7: Superfície de resposta para o aumento máximo da $DQO_{Solúvel}$ em função da temperatura e concentração de biossurfatante sem a ação do *pool* enzimático. 99

Figura 4.8: Aumento da DQO solúvel no decorrer do tempo, em diferentes temperaturas ... 100

Figura 4.9: Efeitos padronizados para o aumento máximo da DQO solúvel, utilizando biossurfatante e *pool* enzimático (*P. simplicissimum*) a 30ºC. 102

Figura 4.10: Superfície de resposta resultante do planejamento experimental tendo como variáveis a concentração de biossurfatante e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* a 30ºC. 103

Figura 4.11: Efeitos padronizados para o aumento máximo da DQO solúvel, utilizando biossurfatante e *pool* enzimático (*P. brevicompactum*) a 30ºC. 105

Figura 4.12: Superfície de resposta resultante do planejamento experimental tendo como variáveis a concentração de biossurfatante e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum*. 106

Figura 4.13: Efeitos padronizados para a produção específica de metano (PEM) utilizando biossurfatante e *pools* enzimáticos (*P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*) para a 1ª e 2ª bateladas. 118

Figura 4.14: Efeitos padronizados para a produção específica de metano (PEM) utilizando biossurfatante e *pools* enzimáticos (*P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*) para a 3ª e 4ª bateladas. 119

Figura 4.15: Produção Específica de Metano (PEM) ao longo dos dias na quinta batelada, com as condições D, H e F (maiores PEM no quarto contato) e L (controle). 120

Figura 4.16: Concentração residual de óleos e graxas (O&G) ao término da quinta batelada, com as condiçoes D, F, H e controle (L). 121

Figura 4.17: Desenho dos biorreatores UASB utilizados no trabalho. 122

Figura 4.18: Carga Orgânica Volumétrica afluente ao reator Controle no 1º (pré marcação) e 2º (pós marcação) regimes. 126

Figura 4.19: Carga Orgânica Volumétrica afluente ao reator Teste no 1º (pré marcação) e 2º (pós marcação) regimes. 126

Figura 4.20: Valores de pH na entrada e saída do reator Controle durante o 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 127

Figura 4.21: Valores de pH na entrada e saída do reator Teste durante o 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 128

Figura 4.22: Alcalinidade Total e Ácidos Voláteis Totais no efluente do reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 128

Figura 4.23: Alcalinidade Total e Ácidos Voláteis Totais no efluente do reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 129

Figura 4.24: Valores da relação Ácidos Voláteis Totais e Alcalinidade para o reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 130

Figura 4.25: Valores da relação Ácidos Voláteis Totais e Alcalinidade para o reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes 130

Figura 4.26: Variação da DQO total de entrada e saída do reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 131

Figura 4.27: Variação da DQO total de entrada e saída do reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 131

Figura 4.28: Variação da DQO solúvel de entrada e saída do reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 133

Figura 4.29: Variação da DQO solúvel de entrada e saída do reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 133

Figura 4.30: Eficiência de remoção de DQO total e solúvel para o reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 134

Figura 4.31: Eficiência de remoção de DQO total e solúvel para o reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 134

Figura 4.32: Concentração de Óleos & Graxas (O&G) na entrada e saída do reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 135

Figura 4.33: Concentração de Óleos & Graxas (O&G) na entrada e saída do reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes. 135

Figura 4.34: Acúmulo de O&G (%, base seca) na escuma dos reatores Controle e Teste. 136

Figura 4.35: Acúmulo de biogás produzido no reator Controle ao longo das horas de operação (Volume de biogás corrigido para CTNP). 137

Figura 4.36: Acúmulo de biogás produzido no reator Teste ao longo das horas de operação (Volume de biogás corrigido para CTNP). 138

Figura 4.37: Relação entre volume de biogás acumulado (CNTP) versus DQO total removida acumulada para o reator Controle. 139

Figura 4.38: Relação entre volume de biogás acumulado (CNTP) versus DQO total removida acumulada para o reator Teste. 139

Figura 4.39: Acúmulo de O&G (% em base seca) no lodo anaeróbio dos reatores Controle e Teste, no 1º e 2º regimes. 141

Figura 4.40: Gel de DGGE de amostras de lodo dos biorreatores UASB nos dois regimes estudados, bem como do inóculo, com concentrações de agentes desnaturantes variando de 40 a 70%, utilizando primers para o Domínio Bacteria. 143

Figura 4.41: Fluxograma para o pré-tratamento de efluente de abate de aves utilizando-se a tecnologia usual. 146

Figura 4.42: Fluxograma para o pré-tratamento de efluente de abate de aves utilizando tecnologia alternativa. 147

Figura 4.43: Distribuição do custo operacional para as plantas A – usual e B- alternativa ... 153

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Características de efluentes da indústria de abate de aves.....26

Tabela 2.2: Tipos de pré-tratamentos utilizados em efluentes de indústria de abate de aves e matadouros 33

Tabela 2.3: Potencial de produção de biogás a partir de diferentes classes de substratos (ALVES *et al*., 2009).....33

Tabela 3.1: *Primers* e grampo CG utilizados para ampliação dos DNA.....70

Tabela 3.2: Condições utilizadas para amplificação do fragmento 16S do domínio Bacteria . 70

Tabela 4.1: Atividades lipásica e proteásica após 48 h de fermentação com os fungos *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium brevicompactum,* média de oito fermentações. 76

Tabela 4.2: Caracterização físico-química do biossurfatante bruto produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1(caldo livre de células) utilizado no trabalho, nas três fermentações (F1, F2 e F3).....78

Tabela 4.3: Atividade lipásica dos *pools* enzimáticos produzidos pelos fungos *P. simplicissimum* e *P. brevicompactum* na presença de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, sendo "BS" – biossurfatante e "CMC" – concentração micelar crítica. 81

Tabela 4.4: Caracterização físico-química do efluente do abatedouro avícola 83

Tabela 4.5: Caracterização do lodo anaeróbio utilizado neste trabalho 85

Tabela 4.6: Solução de macronutrientes (CHERNICHARO, 2007) 87

Tabela 4.7: Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia com adição de diferentes percentuais do preparado enzimático sólido (PES) produzido pelo fungo *P. simplicissimum* 87

Tabela 4.8: Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia com adição de diferentes percentuais do *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum*.....89

Tabela 4.9: Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia com adição de diferentes concentrações do biossurfatante ([ ] BS) do tipo ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 90

Tabela 4.10: Valores reais e codificados das variáveis: concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) e temperatura (T).....92

Tabela 4.11: Valores reais e codificados das variáveis estudadas: concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS), temperatura (T) e *pool* enzimático produzido pelo *Penicillium simplicissimum* (E). 97

Tabela 4.12: Valores reais e codificados das variáveis estudadas: concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) e *pool* enzimático produzido pelo *Penicillium simplicissimum* (E). 97

Tabela 4.13: Matriz codificada e aumento da $DQO_{Solúvel}$ no decorrer dos ensaios tendo como variáveis a temperatura (T) e a concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) 95

Tabela 4.14: Análise de variância para o planejamento do delineamento composto central rotacional utilizando a concentração de biossurfatante e temperatura como variáveis independentes 96

Tabela 4.15: Matriz codificada e aumento da $DQO_{Solúvel}$ no decorrer dos ensaios tendo como variáveis a temperatura (T), a concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1(BS) e de *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum*(T) 97

Tabela 4.16: Análise de variância do planejamento do delineamento composto central rotacional utilizando biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, temperatura e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* 99

Tabela 4.17: Matriz codificada e aumento da DQO solúvel no planejamento experimental utilizando *pool* enzimático produzido pelo *P. simplicissimum* (Es) e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) como variáveis independentes, com temperatura fixa (30ºC) 101

Tabela 4.18: Análise de variância para o planejamento do delineamento composto central rotacional utilizando biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* a 30ºC 102

Tabela 4.19: Matriz codificada e aumento da DQO solúvel no planejamento experimental utilizando *pool* enzimático produzido pelo *P. brevicompactum* (E_b) e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1(BS), com temperatura fixa (30ºC) 104

Tabela 4.20: Análise de variância para o planejamento do delineamento composto central rotacional utilizando biossurfatante e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* a 30ºC 105

Tabela 4.21: Resultado do teste de biodegradabilidade anaeróbia com adição do biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* (Es) 108

Tabela 4.22: Resultado do teste de biodegradabilidade anaeróbia com adição do biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* (E_b) 109

Tabela 4.23: Matriz codificada no planejamento experimental utilizando *pool* enzimático (*P. simplicissimum e P. brevicompactum*) e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 111

Tabela 4.24: Valores reais e codificados das variáveis estudadas: concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (BS) e *pool* enzimático produzido pelos micro-organismos *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium brevicompactum* 111

Tabela 4.25: Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com adição de biossurfatante e *pools* enzimáticos (*P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*) em bateladas sequenciais 113

Tabela 4.26: Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com adição de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e *pools* enzimáticos (P. *simplicissimum e P. brevicompactum*) em bateladas sequenciais 114

Tabela 4.27: Variáveis analisadas com seus respectivos locais e periodicidade 123

Tabela 4.28: Resumo dos resultados obtidos durante a operação dos reatores Controle e Teste. 125

Tabela 4.29: Sólidos Suspensos Voláteis dos reatores Controle e Teste após cada regime estudado 140

Tabela 4.30: Quantidade e custo dos equipamentos necessários para implantação das plantas de tecnologia usual e alternativa para o pré-tratamento de efluente de abate de aves ... 149

Tabela 4.31: Custos operacionais anuais (em reais) para operação das plantas de pré-tratamento usual e alternativa 151

Tabela 4.32: Resumo da avaliação econômica para os cenários: planta usual e planta alternativa. 154

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O tratamento de efluentes líquidos é uma prática que vem ao encontro dos princípios que norteiam o desenvolvimento sustentável, ou seja, "o desenvolvimento que satisfaz as necessidades de uma sociedade sem diminuir as perspectivas das gerações futuras".

A questão ambiental passou a ser encarada pela ótica da dificuldade de se encontrar padrões de equilíbrio de produção, que conciliem o desenvolvimento com o uso racional de água e energia e a minimização de geração de resíduos (PADILHA, SILVA e SAMPAIO, 2006).

A avicultura é, sem dúvida, uma atividade industrial de grande importância econômica e social, sendo um exemplo de atividade agro-pecuária de sucesso. A utilização de modernos sistemas de planejamento e organização, assim como a incorporação de novas tecnologias neste setor, reflete-se no extraordinário e constante crescimento da produção. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de carne de frango (precedido por Estados Unidos e China), com produção de 12,6 milhões de toneladas em 2012 (ABEF, 2012), sendo 31% destinada à exportação e 69% ao consumo interno. Em 2012, a receita com exportação de carne de frango foi de US$ 7,7 bilhões com 4,1 milhões de toneladas exportadas, o que conferiu ao Brasil o posto de primeiro lugar no *ranking* mundial de exportadores (UBABEF, 2013).

O crescimento da produção de carne de aves é um fenômeno mundial e como resultado deste crescimento os abatedouros passaram a produzir quantidades crescentes de resíduos sólidos e líquidos. Neste aspecto, a preocupação com o meio ambiente assume importância na dinâmica da cadeia produtiva de frangos, especialmente pelas exigências legais e mercadológicas, que pressionam as organizações de qualquer natureza a se adequarem aos padrões exigidos. Com isso, o tratamento de resíduos sólidos e efluentes tem emergido como uma das maiores preocupações, não só nas indústrias de processamento de aves, como nas indústrias de carne em geral (SALMINEN e RINTALA, 2002 a, b).

Existe uma variedade de tecnologias que se aplicam ao tratamento desses efluentes. Os tratamentos físico-químicos, com adição de coagulantes químicos (como sulfato de alumínio e cloreto férrico), permitem uma separação parcial da matéria orgânica devido à sedimentação ou flotação de proteínas e gorduras. No entanto, o custo com produtos químicos é elevado, a gordura dissolvida ou emulsionada não é removida de forma eficiente e lodos extremamente

problemáticos para tratamento e descarte são produzidos (LUCAS, KOETZ e PRZYBYLSK, 2000 *apud* VALENTE *et al*., 2010). Devido ao elevado potencial energético dos lipídeos presentes nos efluentes das indústrias de abate de aves, o tratamento biológico anaeróbio é altamente atrativo, pela possibilidade de geração de elevadas quantidades de metano, o qual pode ser utilizado como fonte de energia na própria indústria (VALLADÃO, 2009).

Em biorreatores anaeróbios, entretanto, os lipídeos causam problemas, como o desenvolvimento de lodos com baixa atividade, com inadequadas características físicas e com elevada tendência de flotação; produção de escuma; colmatação do leito de lodo e arraste da biomassa, levando à perda de eficiência e até mesmo ao colapso do reator. Além disso, a adsorção de gorduras à superfície do lodo dificulta o transporte de substratos solúveis para a biomassa, levando à queda da taxa de conversão desses substratos (JEGANATHAN, NAKHLA e BASSI, 2007; PEREIRA, 2004).

Dentre as alternativas propostas para o tratamento de efluentes de difícil degradação observa-se um crescente interesse pela utilização de enzimas como coadjuvantes no processo. As enzimas já são utilizadas em diversos procedimentos nas indústrias alimentícias, oleoquímica, de detergentes, farmacêutica e de química fina (SHARMA, CHISTI, e BANERJEE, 2001), sendo o tratamento de efluentes um campo promissor para utilização das mesmas. Portanto, a aplicação de uma tecnologia híbrida (tratamento enzimático associado ao tratamento biológico) constitui importante recurso para o tratamento de efluentes com elevado teor de gordura. A etapa de pré-tratamento enzimático hidrolisa os triglicedídeos à ácidos graxos e glicerol, permitindo uma melhor atuação da população microbiana em uma etapa posterior de tratamento biológico, reduzindo o diâmetro das partículas, facilitando assim o contato entre biomassa e matéria orgânica (VALLADÃO, CAMMAROTA e FREIRE, 2011).

Na área ambiental, muitos estudos relatam o uso de biossurfatantes para aumentar a interação água/óleo, acelerar a degradação de vários óleos por micro-organismos e promover a biorremediação de águas e solos contaminados (SANTA ANNA *et al*., 2007). A capacidade dos biossurfatantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação destes compostos no meio ambiente (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Os biossurfatantes podem ser usados diretamente para emulsionar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo (MILLIOLI *et al*., 2009). Já no tratamento de efluentes com alto teor de gorduras, gerados em muitas indústrias alimentícias, existem poucos trabalhos na literatura. Neste caso, os biossurfatantes podem facilitar a biodegradação, dissolvendo as gorduras e óleos e podem ser incorporados diretamente no processo biológico,

eliminando processos adicionais de pré-tratamento para remoção das gorduras e resultando em menores custos capitais e operacionais (NAKHLA *et al*., 2003).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos de aplicação de enzimas no tratamento de efluentes com altos teores de gordura desenvolvidos pelo grupo de pesquisa da UFRJ e outros (VALLADÃO *et al*., 2011; ALEXANDRE *et al*., 2011; ROSA *et al*., 2009; JEGANATHAN, BASSI e NAKHLA, 2006; MASSE, MASSÉ e KENNEDY, 2003). Também são encontrados alguns trabalhos sobre aplicação de biossurfatantes no tratamento de efluentes industriais (DAVEREY e PAKSHIRAJAN, 2011; NAKHLA *et al*., 2003). No entanto, a utilização conjunta de enzima e biossurfatante ainda é inédito na literatura, sendo uma abordagem que pode resultar na melhoria do processo de tratamento dos efluentes de indústrias alimentícias com altos teores de gordura, reduzindo problemas operacionais e custos de tratamento e disposição de resíduos, além de possibilitar um aumento da produção de metano nos processos anaeróbios.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo principal do estudo foi avaliar a aplicação conjunta de biossurfatante do tipo ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e *pools* (preparado enzimático sólido) oriundos de diferentes micro-organismos (*Penicillium verrucosum*, *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium simplicissimum*) no tratamento anaeróbio de efluente da indústria de abate de aves com alto teor de gorduras.

Para tal, cumpriram-se as seguintes etapas:

- Produção dos *pools* enzimáticos a partir de fermentação em estado sólido com os fungos *Penicillium verrucosum*, *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium brevicompactum* empregando torta de babaçu como meio de cultura;
- Caracterização dos *pools* enzimáticos produzidos quanto às atividades lipásica e proteásica e quanto ao grau de toxicidade sobre consórcios microbianos anaeróbios;
- Produção do biossurfatante do tipo ramnolipídeo, a partir de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e sua caracterização quanto ao índice de

emulsificação, concentração micelar crítica, tensão superficial, demanda química de oxigênio e quanto ao grau de toxicidade sobre consórcios microbianos anaeróbios;

- Estudo da etapa de solubilização de particulados presentes no efluente, sobretudo gorduras, em planejamento experimental com diferentes combinações de biossurfatante e *pools* enzimáticos, variando tempo e concentração dos componentes do pré-tratamento;
- Avaliação da combinação enzima/biossurfatante que resultasse em melhores remoções de demanda química de oxigênio (DQO) e produção de biogás no tratamento anaeróbio de efluente com alto teor de gordura;
- Avaliação da eficiência do tratamento biológico anaeróbio com e sem a etapa de pré-tratamento enzimática/biossurfatante (na condição selecionada na etapa anterior) do efluente de indústria de abate de aves em reatores contínuos do tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*);
- Análise econômica dos processos usuais de tratamento e do o processo proposto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EFLUENTES DE ABATEDOUROS: CARACTERÍSTICAS E TRATAMENTO

Abatedouros de aves são considerados importantes fontes de poluentes, uma vez que utilizam elevado volume de água quente para limpar e esterilizar carcaças (MARTINEZ *et al*., 2012). A composição dos efluentes gerados pode variar de indústria para indústria, porém, de modo geral, contêm altas concentrações de compostos orgânicos, quantificados como demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e/ou demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio, fósforo, óleos, gorduras e proteínas (MATSUMURA e MIERZWA, 2008, *apud* DEBIK, 2009). Sólidos não solúveis representam de 30 a 75% da carga poluente desses efluentes (MASSE, KENNEDY e CHOU, 2001a). A Tabela 2.1 apresenta um resumo das principais características de efluentes gerados em abatedouros de aves.

A hidrólise de partículas é considerada a etapa limitante da degradação anaeróbia de efluentes contendo elevadas concentrações de sólidos, tanto solúveis quanto insolúveis (MASSE, KENNEDY e CHOU 2001b). De acordo com Sayed *et al.* (1988) *apud* Rosa (2004), os lipídeos representam a fração limitante no tratamento destes sólidos, sendo responsáveis por menos de 1% da DQO solúvel, porém mais de 67% da DQO particulada em efluentes de abatedouros. Os lipídeos apresentam uma taxa de hidrólise menor em relação às outras frações orgânicas e muitas vezes o tratamento anaeróbio é prejudicado devido a dois principais problemas relacionados especificamente à presença de lipídeos nestes efluentes: flotação do lodo (biomassa) devido à adsorção de lipídeos (*washout*) e inibição de bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas por acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (ALVES *et al*., 2009).

Assim sendo, o tratamento deste tipo de material é imprescindível e pode ser realizado por via físico-química ou biológica. A escolha do processo leva em conta o tipo de efluente a tratar, sua biodegradabilidade, a presença de substâncias tóxicas e a produção de lodos, entre outros (MOTTA *et al.*, 2003).

Tabela 2.1: Características de efluentes da indústria de abate de aves

Características	FUCHS *et al.* (2003)	MASSE e MASSÉ (2005)	DEL POZO e DIEZ (2005)	DORS (2006)	DEL NERY *et al.* (2007)	SADDOUD e SAYADI (2007)	NARDI, FUZI e DEL NERY (2008)	HAJAYA e PAVLOSTATHIS (2012)	DAMASCENO *et al.* (2012)
pH	5,3 – 6,8	6,9 ± 0,4	–	6,35	6,5 – 7,0	7,5 – 7,7	6,3 – 7,0	6,9 ± 0,2	6,4
DQO (mg/l)	5800– 20150	7083 ± 1211	1820 ± 60	6700	3102 ± 688	7148 – 20400	3124 ± 594	1275 ± 16	7264
DBO_5 (mg/l)	2200 – 9800	–	900 ± 200	4434	1780 ± 543	3501 ± 8030	2025 ± 352	–	–
O&G (mg/l)	–	168 – 379	170	2005	375 ± 151	233 – 310	182 ± 29	680 ± 28*	2900
SST (mg/l)	2400 – 4700	1592 – 321	430	8390	2457 ± 332	–	861 ±204	125 ± 20	–
NT (mg/l)	301 – 460	547 ± 78	190 ± 50	92	186 ± 27	–	–	133 ± 5	200
PT (mg/L)	–	–	–	8,6	76 ± 36	–	–	–	70

*Sob forma de lipídeos. SST = sólidos suspensos totais; NT = nitrogênio total; PT = fosfato total.

Dentre os tratamentos físico-químicos mais utilizados está o processo de coagulação/floculação seguido de sedimentação ou flotação. O processo consiste na adição de coagulantes (em geral, sulfato de alumínio ou cloreto férrico) ao efluente para redução da repulsão eletrostática entre as partículas suspensas e desestabilização dos colóides, por meio de mecanismos de ligação e adsorção na superfície da partícula coloidal. A etapa de coagulação deve ser realizada sob intensa agitação, possibilitando interações entre o coagulante e as partículas suspensas no efluente. Na etapa de floculação, a agregação das partículas já coaguladas resulta na formação de flocos que, por possuírem maior tamanho, são separados mais rapidamente da suspensão. Para que ocorra a aproximação e o crescimento dos flocos, é necessário que esta etapa seja conduzida sob baixa agitação, limitada pela resistência e cisalhamento dos flocos (DI BERNARDO e DANTAS, 2005).

Tal procedimento resulta na remoção parcial da matéria orgânica devido à separação de proteínas e gorduras. No entanto, o gasto com reagentes é elevado, a gordura dissolvida ou emulsionada não é removida de forma eficiente e lodos extremamente problemáticos para tratamento e descarte são produzidos (LUCAS, KOETZ e PRZYBYLSK, 2000 *apud* VALENTE *et al*., 2010).

Devido ao menor custo de funcionamento e simplicidade operacional, os processos biológicos são, em geral, selecionados para o tratamento de efluentes de origem doméstica e industrial (MOTTA *et al*., 2003). Os processos biológicos dividem-se em aeróbios e anaeróbios, sendo estes últimos selecionados quando os efluentes apresentam elevadas cargas orgânicas biodegradáveis, como no caso dos efluentes gerados em indústrias de abate de aves (NARDI *et al*., 2011).

Em comparação com os processos aeróbios, podem ser destacadas algumas vantagens do tratamento anaeróbio, como: menor produção de biomassa; dispensa o uso de aeração e, em decorrência, apresenta menor consumo de energia; menor consumo de nutrientes (N e P), em função da menor produção de biomassa; geração de gás combustível que, em muitos casos, pode representar um insumo energético relevante; e a biomassa pode ser preservada por longos períodos de tempo sem perda significativa de sua atividade. Como desvantagens pode-se citar: não apresenta alta eficiência de remoção de DQO, exigindo muitas vezes tratamento complementar aeróbio ou físico-químico; é sensível a poluentes tóxicos e inibidores; pode liberar odores ruins; o efluente tratado é praticamente desprovido de oxigênio dissolvido e pode apresentar cor e/ou odor; a partida do reator ou a recuperação de situação instável de funcionamento pode exigir longos tempos de operação (SANT'ANNA JR, 2010).

2.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO ANAERÓBIO

2.2.1 **Etapas da digestão anaeróbia**

A digestão anaeróbia é um processo que ocorre na ausência de oxigênio, no qual bactérias facultativas ou estritamente anaeróbias, juntamente com arqueas metanogênicas, degradam compostos orgânicos complexos, convertendo-os em gases metano e dióxido de carbono. Os micro-organismos envolvidos no processo constituem um sistema ecológico delicadamente balanceado, no qual cada micro-organismo tem uma função essencial (CHERNICHARO, 2007).

Ao contrário dos processos aeróbios, os processos anaeróbios não necessitam de equipamentos de aeração artificial e há geração de biogás (CH_4), que pode ser aproveitado na indústria como fonte de energia. O processo anaeróbio produz menos biomassa, apenas 10 a 20% do volume produzido no aeróbio, devido à reduzida taxa de crescimento dos micro-organismos na população microbiana (MENDES *et al.*, 2005).

A conversão anaeróbia dos compostos orgânicos se dá em quatro estágios:

- No primeiro - a hidrólise, bactérias fermentativas hidrolíticas degradam substâncias orgânicas complexas, como polímeros, transformando-as em compostos mais simples.
- No segundo estágio - a acidogênese, um grupo de bactérias facultativas ou anaeróbias, denominadas formadoras de ácidos ou acidogênicas, transformam os compostos mais simples em outros ainda mais simples, denominados ácidos voláteis (como fórmico, acético, propiônico, butírico, valérico). Embora não ocorra a estabilização da matéria orgânica durante o primeiro e segundo estágios, estes são necessários e fornecem substratos para os micro-organismos ali atuantes.
- No terceiro estágio - a acetogênese, as bactérias acetogênicas transformam a matéria orgânica simples em ácidos com apenas um ou dois átomos de carbono (formiato e acetato), com concomitante produção de hidrogênio.
- No quarto estágio - a metanogênese, a matéria orgânica sofre maior estabilização, através da transformação de ácido acético em gás carbônico e metano (biogás), os quais passam a estar presentes dissolvidos no meio líquido. A obtenção do metano se faz a partir da descarboxilação do acetato e/ou da redução do CO_2 com H_2

(SANT´ANNA JR, 2010). Este processo é realizado por arqueas formadoras de metano (arqueas metanogênicas) (SPEECE, 1996).

A Figura 2.1 apresenta as etapas de degradação de substâncias orgânicas presentes nos efluentes em meio anaeróbio.

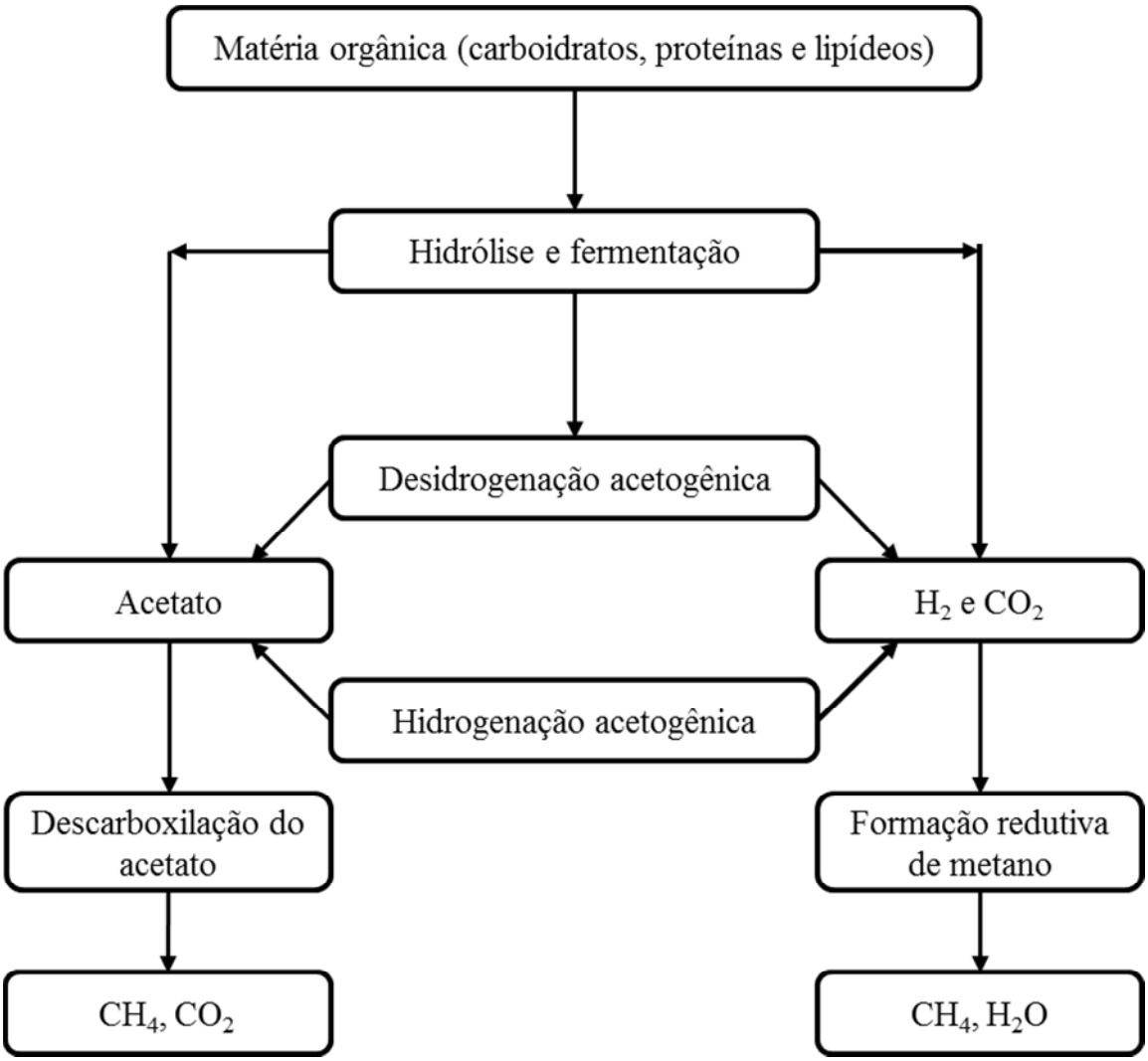


Figura 2.1: Etapas da digestão anaeróbia (adaptado de MCLNERNEY e BRYANT, 1981, *apud* SANT´ANNA JR, 2010).

2.2.2 **Tratamento anaeróbio de efluentes com alta concentração de gorduras**

Embora eficientes, os processos biológicos anaeróbios podem apresentar problemas durante o tratamento de efluentes com altos teores de gordura, tais como o desenvolvimento de lodos com baixa atividade, com inadequadas características físicas e com elevada tendência de flotação; produção de escuma; colmatação do lodo e arraste da biomassa, levando à perda de eficiência e até mesmo ao colapso do reator, conforme mencionado. Além disso, ocorre adsorção de gorduras na superfície do lodo, dificultando o transporte de substratos solúveis para a biomassa e levando à queda da taxa de conversão desses substratos (ALVES *et al*., 2009; DEMIREL, YENIGUN e ONAY, 2005; PETRUY E LETTINGA, 1997).

Na literatura, existem diversos relatos de flotação e *washout* da biomassa devido à adsorção de lipídeos ou ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) em biorreatores empregados no tratamento anaeróbio de efluentes com altas concentrações de gordura. Desde a década de 80, pesquisadores estudam a inibição ocasionada pela presença de ácidos graxos de cadeia longa, intermediários na biodegradação de efluentes contendo material gorduroso, no processo de degradação anaeróbia (HANAKI, MATSUO e NAGASE, 1981). Rinzema, Alphenaar e Lettinga (1989) estudaram o efeito de choques de carga de ácido láurico (12:0) no comportamento físico e biológico do lodo de reatores UASB digerindo acetato, e afirmaram que uma carga de 100 mg ácido láurico/m^3.d inibia totalmente as arqueas metanogênicas acetotróficas. Na tentativa de solucionar o problema causado pela presença do ácido láurico, os autores adicionaram cálcio ao efluente, a fim de realizar a precipitação de ácido láurico, conseguindo aumentar a carga limite para 150 mg/m^3.d. Porém, não conseguiram evitar a flotação do lodo anaeróbio, chegando à conclusão de que se o reator UASB for sobrecarregado com um efluente contendo mais do que 100 mg ácido láurico/m^3.d, dentro de um intervalo de 2 a 8 h, o fenômeno de *washout* e flotação da biomassa será inicializado.

Hawkes, Donnelly e Anderson (1995) observaram baixas retenções de biomassa anaeróbia durante o tratamento de efluente de indústria de sorvetes contendo elevados teores de gordura.

Hwu, Dolon e Lettinga (1996) investigaram a adsorção de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) utilizando reator UASB no tratamento de ácido oleico ou uma mistura de AGCL (oleico, palmítico e esteárico). A adsorção da mistura de AGCL ocorreu mais rapidamente

que o ácido oleico isolado. Segundo os autores, a flotação do lodo anaeróbio era ocasionada pela adsorção dos ácidos graxos nos grânulos e estava mais relacionada à taxa de alimentação do que à concentração de AGCL no efluente. E ainda, que a deterioração do processo de tratamento pela adsorção é mais dependente da flotação do lodo do que da intoxicação da comunidade microbiana anaeróbia. Apesar da adsorção de AGCL ser um pré-requisito para a sua biodegradabilidade, uma adsorção excessiva pode resultar na inibição da metanogênese e na flotação da biomassa *(washout)*.

Pereira, Mota e Alves (2002) relataram taxas de alimentação de 8 e 12 g DQO/L.d em reatores EGSB (*expanded granular sludge blanket*) e filtro anaeróbio durante o tratamento de oleato (como única fonte de carbono e energia), com eficiências de remoção de DQO de 70% e 80 %, respectivamente. No entanto, durante a operação, o rendimento de metano diminuiu de 0,28 para 0,03 L CH_4/g DQO removida no EGSB e de 0,36 para 0,09 L CH_4/g DQO removida no filtro anaeróbio. Estas diferenças entre o rendimento de metano e a eficiência de remoção de DQO demonstram que o oleato não foi degradado e sim acumulado no lodo. Portanto, a eficiência de remoção DQO em reatores tratando efluentes contendo lipídeos/AGCL não pode ser um indicador da eficiência do tratamento, devendo sempre ser associada à produção de metano.

Grande parte dos problemas operacionais mencionados se deve à lenta taxa de biodegradação das gorduras presentes nos efluentes. Lipídeos são degradados mais lentamente pelos micro-organismos em comparação com outros substratos considerados de baixa taxa de biodegradação como, por exemplo, açúcares e aminoácidos. Enquanto açúcares e aminoácidos apresentam constantes de degradação de 0,16 a 0,78 h^{-1}, ácidos graxos de cadeia longa apresentam valores de 0,005 a 0,04 h^{-1}, ou seja, de 10 a 100 vezes menores, em condições experimentais semelhantes (CHIPASA e MEDRZYCKA, 2006). Isto faz dos lipídeos o componente limitante do tratamento e sua hidrólise a ácidos graxos a etapa limitante na biodegradação (MASSE, MASSÉ e KENNEDY, 2003).

Nos sistemas de tratamento biológico, a população microbiana apresenta algumas espécies com capacidade de hidrolisar e assimilar materiais graxos. A Figura 2.2 apresenta as etapas da degradação anaeróbia de gorduras. Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) são degradados por bactérias acetogênicas, via β-oxidação, a acetato e hidrogênio. Se o acetato e o hidrogênio molecular acumularem, o processo de digestão anaeróbia será inibido (HANAKI, MATSUO e NAGASE, 1981). Quando os ácidos graxos apresentam cadeia com número de carbono impar, estes são degradados em acetato, propionato e hidrogênio,

enquanto aqueles que apresentam cadeia com número de carbono par são degradados em acetato e hidrogênio (BRYANT, 1979 *apud* GALLERT e WINTER, 2005). Após a hidrólise, fermentação e acetogênese dos componentes gordurosos, na fase de metanogênese, acetato, CO_2 e hidrogênio são convertidos em biogás. Todas as reações intracelulares subsequentes podem ser influenciadas por interações entre as espécies microbianas, via transferência de hidrogênio, exceto a reação extracelular inicial das lipases (GALLERT e WINTER, 2005).

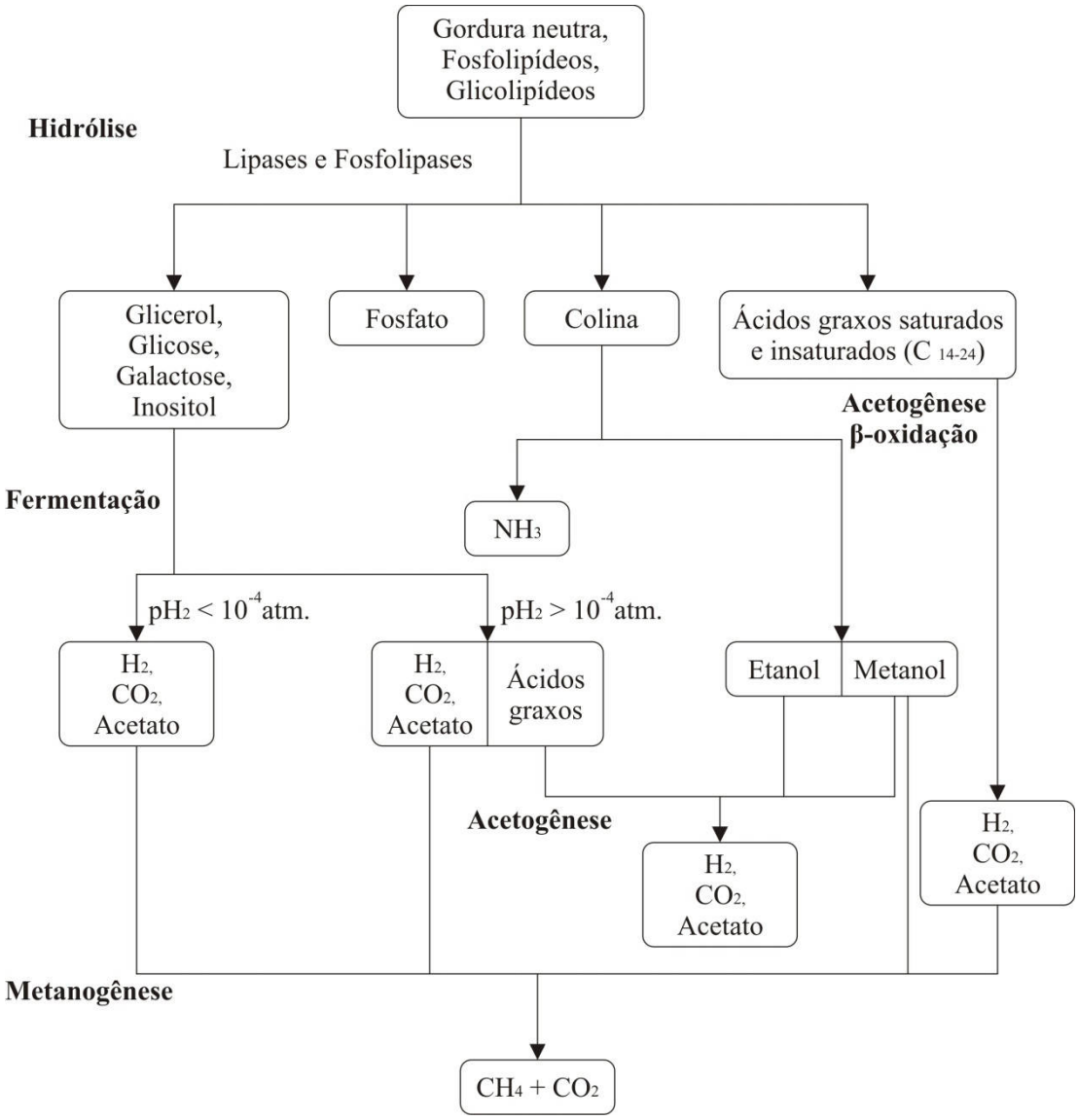


Figura 2.2: Etapas da degradação anaeróbia de gorduras (GALLERT e WINTER, 2005).

Como a velocidade de alimentação de substrato superam a velocidade de degradação, ocorre o acúmulo de gordura na biomassa e os problemas operacionais já mencionados. Por este motivo, o tratamento biológico anaeróbio de efluentes gerados nas indústrias de abate de

aves e matadouros é quase sempre precedido de uma ou mais etapas de pré-tratamento para redução da concentração de gordura, conforme pode ser observado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Tipos de pré-tratamentos utilizados em efluentes de indústria de abate de aves e matadouros

Referências	Tipo de Efluente	Pré-tratamento
Battimelli, Carrère e Delgenès (2009)	matadouro (bois e suínos)	termoquímico (saponificação)
Nardi, Fuzi e Del Nery (2008)	abate de frangos	flotação com cloreto de alumínio e polímero aniônico
Beux, Nunes e Barana (2007)	matadouro (bois e suínos)	flotação seguida de tanque de decantação
Del Nery *et al*. (2007)	abate de frangos	Flotação
Caixeta *et al.* (2002)	matadouro (bois e suínos)	Flotação

Como pode ser observado na Tabela 2.2, a utilização de flotação com ar induzido ou dissolvido, quimicamente auxiliada ou não, é empregada com frequência com a finalidade de remover os óleos e graxas dos efluentes antes dos processos biológicos. Contudo, o custo com ar e reagentes empregados (na flotação quimicamente auxiliada) é elevado, a eficiência de remoção de material dissolvido e/ou emulsionado às vezes é baixa e lodos extremamente difíceis de serem tratados são produzidos (AL-MUTAIRI, AL-SHARIFI e AL-SHAMMARI, 2008; SCHOENHALS, SENA e JOSÉ, 2006). E ainda perde-se grande parte do metano (bioenergia) relacionado com a conversão dos lipídeos, uma vez que, teoricamente, a degradação deste substrato produz maior volume de biogás quando comparado com carboidratos e proteínas, como pode ser verificado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Potencial de produção de biogás a partir de diferentes classes de substratos (ALVES *et al*., 2009)

Substrato	Reação metanogênica	Biogás (L/g)	CH_4 (%)
Lipídeos	$C_{50}H_{90}O_6 + 24{,}5H_2O \longrightarrow 34{,}75CH_4 + 15{,}25CO_2$	1,425	69,5
Carboidratos	$C_6H_{10}O_5 + H_2O \longrightarrow 3CH_4 + 3CO_2$	0,830	50,0
Proteínas	$C_{16}H_{24}O_5N_4 + 14{,}5H_2O \longrightarrow 8{,}25CH_4 + 3{,}75CO_2 + 4NH_4^+ + 4HCO_3^-$	0,921	68,8

Angelidaki e Sanders (2004) afirmaram que, quando submetidos à digestão anaeróbia, os lipídeos apresentam elevado potencial de produção de metano (1,014 L CH_4/g), quando comparados a carboidratos e proteínas (0,415 e 0,496 L CH_4/g, respectivamente), confirmando a teoria relacionada com a transformação dos lipídeos em energia e o

consequente desperdício ao se retirar o material gorduroso e tratá-lo como resíduo cujo destino final são os aterros sanitários ou controlados.

2.2.3 **Tratamento de efluentes em reatores UASB**

O interesse pelo tratamento anaeróbio cresceu muito a partir das três ultimas décadas do século XX (SANTA´ANNA JR, 2010), impulsionando o desenvolvimento de vários tipos de biorreatores com altas concentrações de lodo no seu interior. Um dos modelos que mais se destacou e, portanto, é um dos mais utilizados foi o Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e Fluxo Ascendente (UASB – "*upflow anaerobic sludge blanket*"- Figura 2.3) que consiste de um tanque vertical, no qual o efluente entra pela parte inferior e prossegue em fluxo ascendente até a parte superior do sistema, atravessando três estágios: o leito de lodo, onde há grande concentração de biomassa ativa, que se apresenta na forma floculada ou granulada; em seguida, passa por uma camada de biomassa menos densa, denominada manta de lodo; e finalmente, por um separador trifásico, onde ocorre a separação dos sólidos em suspensão (lodo) do biogás formado no tratamento (CHERNICHARO, 2007).

Neste sistema, a matéria orgânica é convertida principalmente em biogás, o qual tende a ficar preso na biomassa, fazendo-a flotar. Ao encontrar o separador trifásico, parte do lodo, que deveria ser levado com o efluente para fora do reator, toca a parte inferior do decantador, liberando assim o biogás que é retirado do sistema, e precipita novamente. A estabilização da matéria orgânica ocorre nas zonas de reação, leito e manta de lodo, sendo o reator capaz de suportar altas cargas orgânicas volumétricas (kg DQO/m^3.d). Devido à agitação natural provocada pelo próprio fluxo hidráulico ascendente e gases gerados na digestão da matéria orgânica, o reator dispensa qualquer dispositivo adicional de mistura (CHERNICHARO, 2007).

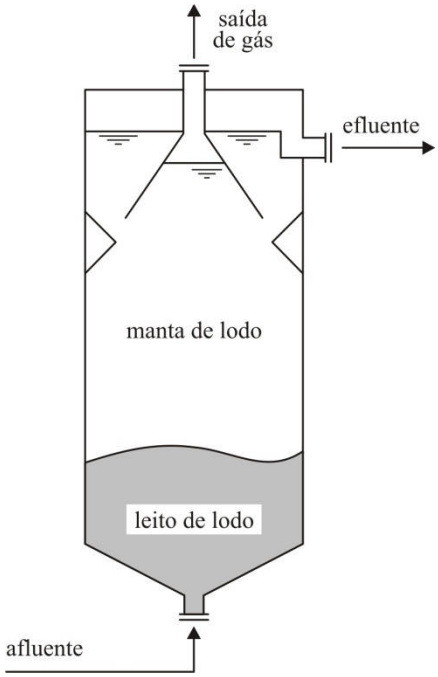


Figura 2.3: Desenho esquemático do reator UASB (CHERNICHARO, 2007).

Este reator pode ser aplicado diretamente para tratar uma grande variedade de efluentes, sejam de natureza simples ou complexa, de baixa ou alta concentração. De acordo com Santa'Anna Jr (2010), sua configuração permite o desenvolvimento e a retenção de uma grande quantidade de biomassa ativa (concentrações de lodo anaeróbio superiores a 30 g SSV/L), conferindo-lhe um elevado tempo de retenção celular. Adicionalmente, devido à sua adequada agitação e mistura hidráulica, que favorecem um melhor contato biomassa-efluente, pode acomodar altas cargas orgânicas volumétricas, com tempo de retenção hidráulica relativamente curto (DEMIREL, YENIGUN e ONAY, 2005 *apud* ROSA, 2008). Um levantamento apresentado por van Haandel *et al*. (2006) indica valores de tempos de retenção hidráulica na faixa de 2 a 20 h, para sistemas operados a temperaturas superiores a 20ºC.

Os princípios mais importantes que regem um reator UASB são: máximo contato entre biomassa e substrato, assegurado pelo fluxo ascendente; minimização de curtos-circuitos hidráulicos; dispositivo eficiente para separar adequadamente o biogás, o líquido e os sólidos e o lodo na região da manta deve ser bem cultivado, apresentar alta atividade metanogênica específica (AME) e excelente sedimentabilidade (KATO *et al.*, 1999 *apud* CAMPOS *et al.*, 2005).

A gordura também é um problema na operação destes reatores e suas variantes. Menos de 60% da DQO foi convertida a metano na operação de um reator UASB tratando efluente

de indústria de sorvetes. A gordura não metabolizada aglomerava e flotava no topo do reator como uma camada de escuma (YANG e ANDERSON, 1993 *apud* SPEECE, 1996). Rinzema, van Veen e Lettinga (1993, *apud* SPEECE, 1996) relatam que o separador trifásico de um reator de leito granular expandido (EGSB – *expanded granular sludge bed*) precisou ser modificado para prevenir o excessivo *washout* da biomassa durante o tratamento de emulsões de triglicerídeos de indústria de laticínios. O EGSB foi equipado com uma espécie de peneira para tornar o tratamento anaeróbio estável. Um reator híbrido com uma camada de espuma de poliuretana reticulada flotando acima do leito expandido, por outro lado, não prevenia o *washout* de biomassa. Havia uma conversão relativamente pobre do material orgânico removido a metano como resultado da flotação dos lipídeos, mesmo sob cargas orgânicas muito baixas.

Rinzema, Alphenaar, e Lettinga (1993; 1989) testaram o tratamento de efluentes contendo AGCL em reatores UASB, relatando sobrecarga de AGCL e severa perda de biomassa causada pela flotação do lodo. Sam-Soon *et al*. (1991) utilizaram um reator UASB no tratamento de ácido oleico como única fonte de carbono orgânico e observaram que os *pellets* originalmente inoculados sofreram desintegração e encapsulamento por uma massa gelatinosa e esbranquiçada, relacionada ao acúmulo de material gorduroso no lodo anaeróbio, o que resultou em baixa eficiência do sistema na remoção da DQO (apenas 65%).

Hwu *et al*. (1998) estudaram a relação entre biossorção de AGCL, intermediários na biodegradação de lipídeos, e a flotação de lodo anaeróbio em reatores tipo UASB. Os autores constataram que a flotação da biomassa (lodo) dependia da carga de AGCL aplicada ao reator. Quanto maior a carga, em menor intervalo de tempo se dava a flotação, tendo início com uma carga de 0,09 g DQO/g SSV.d. A flotação completa do lodo aconteceu quando a carga foi de 0,2 g DQO/g SSV.d. Estes resultados sugerem que o *washout* no tratamento de águas residuárias com alto teor de gordura em reatores UASB é iniciado antes do processo inibitório da metanogênese.

Miranda, Henriques e Monteggia (2005) estudaram o desempenho de um reator UASB em grande escala (800 m^3), tratando efluente do abate e processamento de carne suína com alto teor de gordura. Nos primeiros 180 dias de operação, o reator recebeu o efluente sem pré-tratamento, o que resultou em acentuada perda de biomassa (*washout*) devido à hidrofobicidade causada pela camada lipídica adsorvida aos grânulos do lodo anaeróbio. Após a falha do sistema devido à presença de óleos e graxas, foi implementada uma unidade de pré-

tratamento físico-químico, o que resultou em aumento da eficiência de remoção de DQO de 70,6 para 92,6% e um desempenho estável e eficiente.

Jeganathan, Nakhla e Bassi (2006) utilizaram três reatores UASB, operando de formas distintas, no tratamento de um efluente complexo, oleoso, gerado em indústria alimentícia. Os autores relataram que todos os reatores alcançaram remoções de DQO e óleos e graxas (O&G) acima de 80%, operando com carga de 3 kg DQO/m^3.d. Porém, ao se elevar a carga para valores próximos a 5 kg DQO/m^3.d e a concentração de O&G para aproximadamente 1 g O&G/g SSV, todos os sistemas entraram em colapso, com desempenho se deteriorando drasticamente, devido à flotação do lodo anaeróbio e consequente *washout* da biomassa.

2.3 ENZIMAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Uma alternativa interessante para contornar os problemas operacionais decorrentes do acúmulo de gordura nos biorreatores e os elevados custos dos processos físico-químicos seria a utilização de enzimas hidrolíticas no pré-tratamento destes efluentes, auxiliando na etapa da hidrólise e facilitando o acesso dos micro-organismos aos substratos.

Enzimas são consideradas catalisadores naturais (HASAN, SHAH e HAMEED; 2006), apresentando características peculiares que favorecem seu emprego em processos biotecnológicos e relevantes vantagens em conversões enzimáticas nos processos industriais. Toda enzima, em razão da sua grande especificidade, catalisa as transformações moleculares com baixa ou nenhuma ocorrência de reações paralelas indesejáveis, comuns em sínteses químicas (COLEN, 2006).

Nos últimos anos, enzimas vêm sendo utilizadas como alternativa ao tratamento convencional de efluentes e têm despertado interesse de vários grupos de pesquisa em função de algumas vantagens, entre as quais pode-se citar: o aumento de poluentes orgânicos recalcitrantes, o que diminui a possibilidade de se realizar um tratamento biológico convencional ou químico eficientes; o crescente reconhecimento da capacidade das enzimas de atuar sobre poluentes específicos no tratamento; e avanços recentes da biotecnologia, que permitiram a produção economicamente viável de enzimas (MENDES *et al*., 2005).

Dentre várias possibilidades, estes biocatalisadores podem ser usados no tratamento de diversos tipos de águas residuárias, como por exemplo: efluentes com contaminantes fenólicos, pesticidas, surfatantes, metais pesados ou cianetos, resíduos da indústria de celulose e papel, resíduos da indústria alimentícia, na desidratação de lodos, na bioconversão de cascas

de crustáceos e na degradação de pectina (JORDAN e MULLEN, 2007; BEVILAQUA *et al*., 2002; KARAM e NICELL, 1997).

No entanto, a utilização de enzimas no tratamento de efluentes deve seguir alguns critérios, antes de sua aplicação, como por exemplo: os produtos gerados pela reação devem ser menos tóxicos e mais biodegradáveis, sendo assim mais facilmente removidos por tratamentos subsequentes; a enzima deve ser capaz de catalisar seletivamente a degradação do composto alvo no efluente; deve ser ativa e estável nas condições de tratamento; os reatores devem ser simples e as enzimas obtidas devem ter o menor custo possível (AITKEN *et al*., 1994).

Portanto, no processo de tratamento de efluentes, as enzimas não podem representar elevação significativa dos custos do processo. Tendo em vista este fato, a utilização de preparações comerciais é economicamente inviável, visto que apresentam custo elevado. Dessa forma, é crescente a busca de alternativas viáveis e de baixo custo para a produção de enzimas como, por exemplo, a produção através do processo de fermentação em estado sólido (CASTILHO *et al*., 2000).

Dentro deste contexto, as lipases fúngicas têm sido produzidas por fermentação em estado sólido e aplicadas com sucesso no tratamento de efluentes de indústrias de alimentos como: laticínios, abatedouro de aves e pescado em escala laboratorial (CAMMAROTA e FREIRE, 2006). Por ser o objeto de estudo do presente trabalho este grupo de biocatalisadores será apresentado a seguir com mais detalhes.

2.3.1 **Lipases**

As lipases constituem um importante grupo de enzimas associadas ao metabolismo e hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. Esta classe de biocatalisador é encontrada em vegetais, animais e em micro-organismos (TREICHEL *et al*., 2010). As lipases microbianas estão recebendo muita atenção com o rápido desenvolvimento da tecnologia enzimática. Segundo Hasan, Shah e Hameed (2006), as lipases constituem o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas.

As lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânica-aquosa, como catalisadores em reações de hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em acilgliceróis, liberando ácidos orgânicos e glicerol (SAXENA *et al*., 2003). Essas reações ocorrem com elevada régio e/ou

enâncio seletividade, conferindo a estas enzimas um grande potencial biotecnológico (FREIRE e CASTILHO, 2008, 2000; FERRER, MONTESINOS e VALERO, 2002).

Em plantas, as lipases estão presentes em vegetais superiores como a mamona – *Ricinus communis* (CAVALCANTI *et al.,* 2007) e pinhão manso – *Jatrophas curcas* (SOUSA *et al*., 2010), sendo também encontradas como reserva de energia em diversas espécies (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001).

Os substratos mais comuns das lipases são os triacilgliceróis de cadeia longa, sendo que a hidrólise destes triacilgliceróis resulta na formação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol, como ilustrado na Figura 2.4.

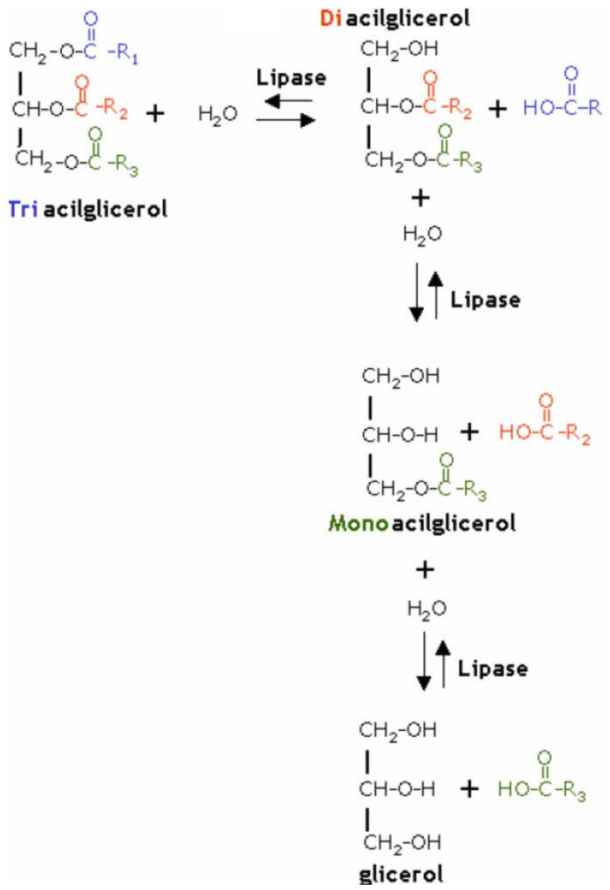


Figura 2.4: Hidrólise de triacilgliceróis pela ação de lipases (HARALDSSON, 1991).

Quando produzidas via fermentação microbiana, as lipases são, em sua maioria, extracelulares, o que facilita os processos de extração e purificação das mesmas, além de permitir fácil controle das condições de cultivo, que pode ser realizado em escala industrial

com baixos custos, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva (FREIRE e CASTILHO, 2008, 2000).

Os fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como sendo as melhores fontes de obtenção de lipases, com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas (CARDENAS *et al.,* 2001). Grande número de lipases de fungos filamentosos tem sido estudadas extensivamente sob os pontos de vista genético e bioquímico. As espécies melhores produtoras descobertas pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor* (STOCKLEIN *et al*., 1993).

A maioria das pesquisas sobre lipases visa à caracterização estrutural, elucidação do mecanismo de ação, cinética, clonagem e sequenciamento de genes e características gerais do seu desempenho (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001). No entanto, na ultima década,53 houve expressivo aumento do estudo de produção e aplicação destas enzimas.

As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: sua alta estabilidade em solventes orgânicos; não requer a presença de co-fatores; possui larga especificidade pelo substrato; e exibe alta enantio-seletividade (CASTRO *et al*., 2004 *apud* DORS, 2006).

As lipases são utilizadas nas indústrias de detergentes e alimentícias (reações de hidrólise), na indústria farmacêutica, de química fina, de cosméticos, de óleos e gorduras, de couro, de polpa e papel, em aplicações biomédicas, como biossensores e até mesmo no tratamento de efluentes industriais (SAXENA *et al.*, 2003). No entanto, esta última aplicação requer preparações enzimáticas de menor custo, obtidas através da produção por fermentação em estado sólido com rejeitos da agroindústria (FREIRE e CASTILHO, 2008; CASTILHO *et al*., 2000).

A utilização de preparações enzimáticas obtidas por fermentação em estado sólido (FMS) no pré-tratamento de efluentes com alto teor de gordura tem sido estudada pelo Grupo de Tecnologia Ambiental e Biotecnologia Microbiana (EQ/IQ – UFRJ) (CAMMAROTA *et al*., 2013; DAMASCENO, FREIRE e CAMMAROTA*,* 2012, 2008, VALLADÃO *et al*., 2011; VALENTE *et al*., 2010; CAMMAROTA e FREIRE, 2006; LEAL *et al*., 2006; ROSA, FREIRE e CAMMAROTA, 2006).

2.3.2 **Fermentação em estado sólido**

Existem dois tipos principais de processos fermentativos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FMS). A quantidade de água livre no estado de cultura é o principal parâmetro que difere estes dois processos. Na FS, a quantidade de sólidos não ultrapassa 5%, enquanto na FMS o conteúdo de sólidos varia de 20 a 70%. Portanto, a FMS é definida como o crescimento de micro-organismos sobre materiais sólidos, na ausência ou quase ausência, de água livre (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2002).

A FMS possui como características: o meio de cultivo sem fase líquida, com baixa espessura e disponibilidade de água suficiente para o crescimento e metabolismo dos micro-organismos; a presença de substratos insolúveis em água; a absorção de nutrientes do meio sólido pelos micro-organismos; altas concentrações de inóculo; obtenção de oxigênio predominantemente da fase gasosa; agitação facultativa; crescimento fúngico com penetração das hifas no substrato sólido; células de bactérias e leveduras crescendo por adesão ao substrato sólido; e a geração de produtos mais concentrados (MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2002).

Assim, a FMS é um processo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, empregando sólidos umedecidos, onde a quantidade de água é suficiente apenas para permitir o crescimento do micro-organismo, estando próxima da capacidade máxima de absorção do material sólido (RAHARDJO, TRAMPER e RINZEMA, 2006; MITCHELL, BEROVIC e KRIEGER, 2002). Dentre os diversos tipos de micro-organismos capazes de crescer nestas condições, destacam-se os fungos filamentosos sendo, por isso, os mais utilizados.

A FMS apresenta como vantagens (RIVERA-MUÑOZ *et al*., 1991): possibilidade de utilização de meios de cultivo simples e econômicos, como resíduos agro-industriais; menor volume de meio reacional; condições semelhantes ao *habitat* natural dos fungos; inoculação direta com esporos, não sendo necessária uma série de pré-cultivos; reduzida probabilidade de contaminação devido aos baixos teores de umidade; rendimentos normalmente superiores aos da FS; maior facilidade de recuperação do produto em função de sua maior concentração e menor quantidade de água; produção de enzimas extracelulares mais concentradas; e emprego de equipamentos pequenos e de baixa complexidade.

Apesar de inúmeras vantagens, a FMS também apresenta algumas desvantagens, dentre as quais pode-se destacar: sistema heterogêneo; elevado custo com energia quando há necessidade de agitação do substrato; necessidade de um pré-tratamento do substrato;

monitoramento e controle de parâmetros dificultados; intensa mão de obra; e necessidade de grande quantidade de esporos para inoculação na fermentação fúngica (FREIRE e CASTILHO, 2000).

Vários estudos estão sendo conduzidos para utilização de enzimas produzidas por FMS no tratamento de efluentes. Tais estudos têm como objetivo principal a redução de custos, uma vez que a FMS pode utilizar substratos oriundos de rejeitos industriais, tais como a torta de babaçu (GUTARRA *et al*., 2009, 2007; AZEREDO *et al.,* 2007; GOMBERT *et al.*, 1999), o resíduo da prensagem de amendoim (BEUCHAT, 1982), torta de gergelim (KAMINI, MALA e PUVANAKRISHNAN, 1998), e soja (VARGAS *et al.,* 2008), entre outros.

Neste contexto, Gutarra *et al.* (2007) estudaram a produção de lipase por por FMS com *Penicillium simplicissinum*, empregando torta de babaçu como substrato, com resultados bastante promissores. Este fungo apresentou uma alta produção de lipase (20,2 U/g), sendo capaz de manter um nível elevado de produção da enzima no decorrer da fermentação. A caracterização parcial da lipase indica que a preparação obtida apresenta características de termoestabilidade em uma faixa de pH de 5,0 a 7,0 (GUTARRA *et al*., 2009).

Silva *et al.* (2011) estudaram a produção de lipases por *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium verrucosum* em fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como matéria-prima. As atividades máximas obtidas com *P. brevicompactum* foram de 48,6 e 87,7 U/g em torta de babaçu e de mamona, respectivamente. Maiores atividades de esterificação (cerca de 244 U/g) foram obtidas quando *P. brevicompactum* foi usado como micro-organismo e torta de babaçu como meio basal, o que o torna bastante promissor para aplicações ambientais.

2.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM ALTO TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS UTILIZANDO ENZIMAS

Efluentes de indústrias alimentícias são ricos em gorduras e proteínas (moléculas orgânicas) que são lentamente biodegradadas. Altos teores de lipídeos nos efluentes causam grande impacto ambiental porque estes criam filmes na superfície da água, impedindo a transferência de oxigênio do ar atmosférico para a água, causando a morte de muitos organismos aquáticos (CAMMAROTA e FREIRE, 2006).

Apesar de geralmente clivarem triacilgliceróis específicos, as lipases podem não ser totalmente específicas e catalisar reações de hidrólise de triacilgliceróis que contêm, em sua

composição, diferentes ácidos graxos, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura (SAXENA *et al*., 2003).

Mendes *et al.* (2010) estudaram efluentes de laticínios, ricos em lipídeos, parcialmente hidrolisados com lipase comercial oriunda de pâncreas de suínos (1,770 U/mg). Verificou-se a eficiência do pré-tratamento em testes de biodegradabilidade anaeróbia com efluente bruto e pré-hidrolisado, utilizando duas concentrações de enzimas (0,05 e 0,5% m/v). Os autores afirmam que todas as amostras pré-tratadas mostraram efeito positivo na remoção de matéria orgânica (demanda química de oxigênio- DQO) e formação de metano. Melhores resultados foram obtidos quando a hidrólise e biodegradação foram realizadas simultaneamente, utilizando a enzima em baixa concentração (0,05% m/v), clarificando o efluente e sendo uma alternativa aos métodos tradicionais de tratamento de efluentes.

Jeganathan, Bassi e Nakhla (2006) estudaram a hidrólise de óleos e graxas (O&G) de águas residuárias provenientes de uma indústria de ração animal. O efluente continha alta concentração de O&G, o que dificultava o tratamento biológico convencional. Os autores utilizaram lipase de *Candida rugosa* imobilizada em alginato de cálcio (atividade lipásica de 890 U/mg, a 35ºC durante três dias). Obtiveram-se remoções de 65 e 69% de DQO e O&G, respectivamente, contra 49 e 45% para o biorreator utilizado como controle. Durante o experimento, aproximadamente 65% das pérolas de alginato foram recuperadas após a hidrólise e aproximadamente 70% da atividade enzimática permaneceu no meio suporte. Este estudo mostrou o potencial da lipase imobilizada em uma etapa de pré-tratamento de águas residuárias da fabricação de ração animal.

A hidrólise de lipídeos de efluentes gerados em frigoríficos avícolas, empregando lipase microbiana de *Candida rugosa*, foi realizada por Pereira, Castro e Furigo Jr. (2003). Porcentagens de hidrólise mais elevadas foram alcançadas em efluentes tamponados no pH ótimo de atuação (pH 7,0). Verificou-se a influência das concentrações de enzima, agente emulsificante (goma arábica) e íons cálcio no desempenho da hidrólise dos lipídeos, por um período máximo de 6 horas. A porcentagem de hidrólise máxima obtida foi de 20,9%, para uma concentração de enzima de 0,4% (m/v) e 3% (m/v) de agente emulsificante.

Leal *et al*. (2006) estudaram efluentes de laticínios contendo elevados teores de O&G (200, 600 e 1000 mg/L) tratados em dois biorreatores anaeróbios do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), sendo um deles alimentado com efluente pré-tratado por um *pool* de enzimas hidrolíticas produzidas pelo fungo *P. restrictum* em fermentação em estado sólido e o outro com o efluente bruto. A hidrólise enzimática ocorreu com 0,1% (m/v) do preparado

enzimático sólido (PES – com 21,8 U/g de atividade lipásica) durante 14 horas a 35ºC. As remoções médias de DQO foram de 90% no biorreator que recebeu o efluente pré-hidrolisado, enquanto que no biorreator que recebeu o efluente bruto a eficiência decaiu de 91% (com 600 mg O&G/L) para 82% (com 1000 mg O&G/L), chegando-se à conclusão de que os biorreatores do tipo UASB conseguem operar, sem muitos problemas operacionais, quando alimentados com efluentes contendo até 600 mg O&G/L.

Existem poucos trabalhos disponíveis na literatura sobre a utilização de enzimas no tratamento de efluentes de abatedouros. Em uma série de estudos, Masse, Kennedy e Chou (2001a) descreveram a utilização de uma lipase pancreática comercial (PL- 250, Genecor International) na hidrólise de partículas de gordura provenientes de efluente de abatedouro. A eficiência do processo de hidrólise foi confirmada através da redução do diâmetro das partículas, assim como pela verificação da produção de ácidos graxos de cadeia longa.

Apurando, porém, o efeito da pré-hidrólise enzimática no tratamento de efluente de abatedouro contendo 550 mg/L de gordura em reator ASBR (*anaerobic sequencing batch reactor*), os autores (MASSE, MASSÉ e KENNEDY, 2003) não obtiveram diferenças significativas entre reatores alimentados com efluentes pré-hidrolisados e reatores alimentados com efluentes sem a etapa de hidrólise enzimática. Cabe ressaltar, no entanto, que a concentração de gordura no efluente testado apresentava valor muito baixo após a diluição do efluente bruto. Valores maiores de gordura provavelmente conduziriam a resultados diferentes entre os reatores. Além disso, preparações enzimáticas comerciais, além de não se apresentarem como uma opção viável, contêm uma série de compostos como conservantes e estabilizantes que poderiam influenciar negativamente o metabolismo do lodo anaeróbio utilizado.

Visto que a utilização de preparados enzimáticos já havia sido testada com sucesso no tratamento de efluentes de laticínio pelo Núcleo de Biotecnologia da UFRJ e dada a falta de literatura disponível em relação à utilização de enzimas em efluentes de abatedouros, Valladão, Freire e Cammarota (2007) estudaram a aplicação de uma etapa de pré-hidrólise enzimática no tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro contendo elevados teores de gordura. Neste estudo foi avaliada a aplicação de diferentes concentrações de um preparado enzimático sólido (PES), obtido através de fermentação em estado sólido com o fungo *P. restrictum* em meio constituído de rejeito agroindustrial denominado torta de babaçu, no tratamento de efluente de abatedouro contendo diferentes teores de óleos e graxas (O&G). Após a etapa de produção do preparado enzimático foram realizados testes para avaliação da

hidrólise do efluente contendo teores de O&G que variavam entre 150 e 1200 mg/L por concentrações de PES de 0,1; 0,5 e 1,0% (m/v). Bons resultados foram obtidos quando utilizada a concentração de 0,1% de PES na pré-hidrólise. Por meio do acompanhamento de cinéticas de consumo de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e produção de biogás foi comprovada a eficiência da etapa de pré-hidrólise enzimática, mesmo quando empregadas reduzidas concentrações de PES (0,1% m/v), na aceleração do consumo de nutrientes e tratamento do efluente contendo o maior teor de O&G testado (1200 mg/L) (VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007).

Apesar dos bons resultados observados com a utilização de 0,1% de PES, Valladão (2005) encontrou resultados imprevistos quando utilizadas maiores concentrações, como 0,5 e 1,0 % de PES, durante a pré-hidrólise. Esperava-se que maiores concentrações de enzimas nesta etapa liberassem maiores quantidades de ácidos graxos e que estes fossem facilmente utilizados durante o tratamento anaeróbio. Dados encontrados demonstraram que a utilização das maiores concentrações de PES durante a pré-hidrolise promoveram um efeito inibitório no tratamento anaeróbio. Foram cogitadas duas hipóteses para a explicação deste fenômeno. A primeira seria a possível presença de compostos tóxicos no PES, já que a composição do mesmo não é totalmente conhecida. A segunda seria a formação de elevadas quantidades de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) durante a pré-hidrólise, que são conhecidos inibidores dos sistemas anaeróbios devido à toxicidade aos micro-organismos anaeróbios e a baixa velocidade de crescimento de micro-organismos consumidores dos mesmos (SALMINEN e RINTALA, 2002a).

Dors (2006) estudou a adição de lipases pancreáticas comerciais em testes de biodegradabilidade de efluente de indústria de abate de aves. Foram realizados tratamentos enzimáticos variando as concentrações de enzima de 0,10% a 0,35% (m/v). O efluente foi biodegradado por aproximadamente trinta dias em um banho-maria a uma temperatura de 35°C com agitação de 100 rpm. A atividade enzimática foi influenciada pelo tipo de substrato, uma vez que quando se utilizou azeite de oliva como substrato (utilizado como padrão) a atividade máxima ficou acima de 3000 U/mg, enquanto que utilizando o efluente bruto como substrato a atividade enzimática máxima diminuiu para valores abaixo de 700 U/mg. Foram obtidas remoções de DQO de 2,3 a 2,86 vezes maiores do que a remoção obtida com o efluente bruto, sem o tratamento enzimático. A concentração de enzima, dentro da faixa estudada, não interferiu consideravelmente na velocidade de remoção da matéria orgânica.

Valladão, Freire e Cammarota (2009) estudaram o tratamento de efluente de abatedouro de aves bruto e pré-tratado enzimaticamente (0,1% PES, por 4 horas) em biorreatores do tipo UASB e verificaram maiores valores de produção de metano, assim como elevados valores de remoção de DQO (882 mL CH_4/d e 93,5%) para o biorreator alimentado com efluente pré-tratado, quando comparado ao biorreator alimentado com efluente bruto (642 mL CH_4/d e 91,0% de remoção de DQO).

2.5 PRODUÇÃO DE BIOSSURFATANTES E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

2.5.1 **Surfatantes**

Segundo Nitschke e Costa (2007), os surfatantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica (Figura 2.5). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfótera. Com a presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfatantes tendem a se distribuir nas interfaces de fases fluidas com diferentes graus de polaridade (água/óleo e óleo/água).

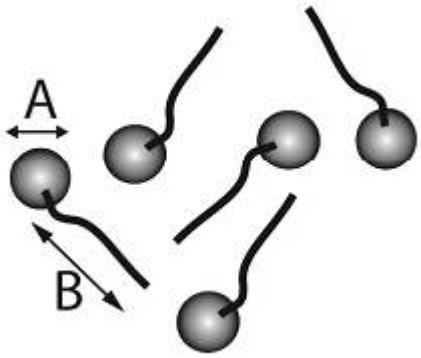


Figura 2.5: Representação esquemática da estrutura de um surfatante. A – cabeça hidrofílica; B – cauda hidrofóbica (PEREIRA, 2011).

A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial (Figura 2.6), sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfatantes, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante,

solubilização e dispersão de fases. Tais propriedades tornam os surfatantes adequados para um grande número de aplicações industriais (SINGH *et al*., 2007).

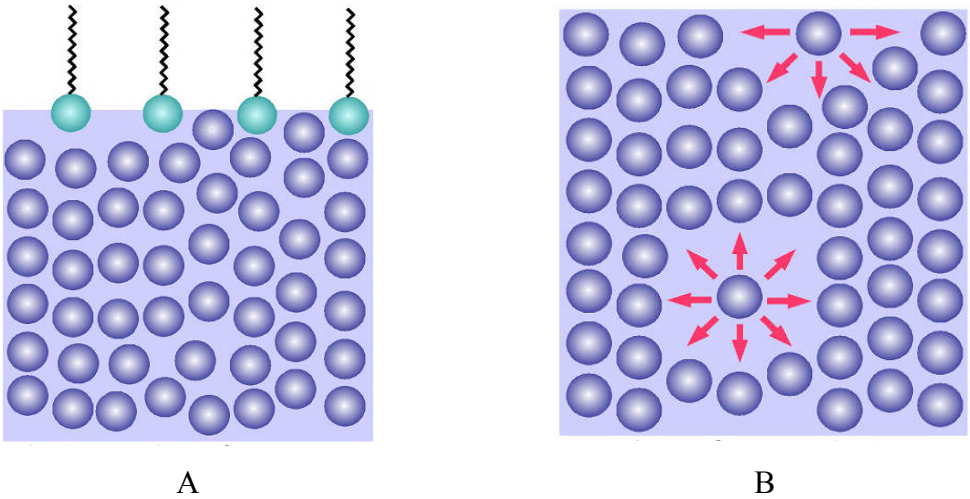


Figura 2.6: Representação da alocação dos surfatantes na superfície de um líquido polar (A) e no interior do líquido (B) (ZANA, 2005 *apud* CARA, 2009).

A particular estrutura dos surfatantes faz com que estes possuam uma importante capacidade de auto-agregação em solução. Quando as moléculas de surfatante se agregam, formam estruturas organizadas denominadas micelas, como pode ser visualizado na Figura 2.7.

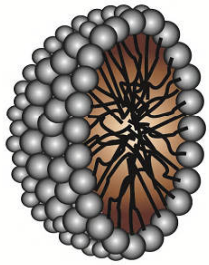


Figura 2.7: Representação esquemática da auto-agregação das moléculas de um surfatante (micela). Fonte: Pereira, 2011.

As micelas são formadas quando a concentração micelar crítica (CMC) é alcançada (Figura 2.8). Surfatantes eficientes possuem baixa concentração crítica de micelas, isto é, quantidades menores de surfatante são necessárias para diminuir a tensão superficial (MULLIGAN, 2005).

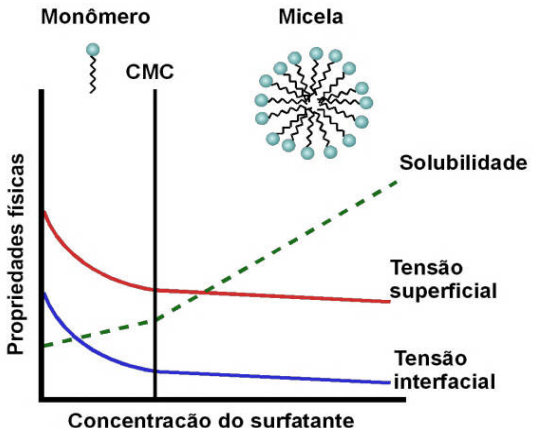


Figura 2.8: Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração de surfatante (MULLIGAN, 2005 adaptado por CARA, 2009).

Os compostos insolúveis ou pouco solúveis em água podem ser solubilizados no interior das micelas, na região apolar, como exposto na Figura 2.9 (MULLIGAN, 2005).

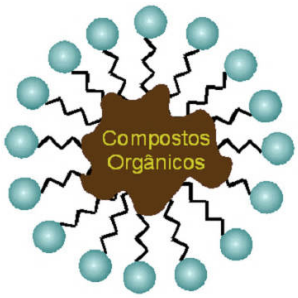


Figura 2.9: Representação esquemática da solubilização de compostos apolares no interior de micelas (CARA, 2009).

2.5.2 **Biossurfatante**

Os compostos de origem microbiana que contêm propriedades surfatantes, isto é, que diminuem a tensão superficial (possuem alta capacidade emulsificante), são denominados biossurfatantes e consistem em produtos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Os biossurfatantes possuem a capacidade de emulsificar e dispersar os hidrocarbonetos em água, tornando-os disponíveis para que sejam naturalmente retirados do ambiente, através de processos como solubilização e mineralização (CHUN, LEE e PARK, 2002).

Devido ao aumento da preocupação com a proteção ambiental, os biossurfatantes passaram a ser considerados como alternativas ambientalmente corretas comparativamente aos surfatantes sintéticos (SARACHAT *et al*., 2010). Os biossurfatantes apresentam vantagens sobre surfatantes sintéticos por apresentarem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (RODRIGUES *et al*., 2006).

Os biossurfatantes podem ser classificados por sua estrutura química, sendo divididos entre os de alta massa molecular (polissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas e lipoproteínas) e os de baixa massa molecular (lipopeptídeos, glicolipídeos e ácidos graxos) (BANAT *et al*., 2010).

A concentração micelar crítica dos biossurfatantes varia de 1 a 200 mg/L, enquanto sua massa molecular situa-se entre 500 e 1500 Da (LANG e WAGNER, 1987). A presença de diferentes porções hidrofílicas faz com que os biossurfatantes sejam agrupados em diferentes classes, de acordo com sua composição, podendo-se citar como exemplos os glicolipídeos (são os mais conhecidos, constituídos por carboidratos combinados com ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos - DESAI e BANAT, 1997), os fosfolipídeos (formados por uma molécula de glicerol unida a dois ácidos graxos por meio de ligações éster e a um grupamento fosfato - BOGNOLO, 1999), os lipopeptídeos (são produzidos principalmente por espécies do gênero *Bacillus*). Essas moléculas apresentam propriedades tensoativas, sendo que algumas também possuem propriedades antimicrobianas. São exemplos de lipopeptídeos: viscosina, subtilisina e surfactina (DESAI e BANAT, 1997).

Diversos micro-organismos são estudados na produção de agentes biossurfatantes, podendo-se citar como exemplo bactérias do gênero *Pseudomonas,* que são capazes de usar diferentes substratos como glicerol, manitol, frutose, glicose, n-parafinas e óleos vegetais para produzir biossurfatantes à base de ramnolipídeos (SANTA ANNA *et al*., 2002).

2.5.2.1 Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos são biossurfatantes da classe dos glicolipídeos produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. São compostos anfifílicos constituídos por moléculas de ramnose na sua porção hidrofílica e por cadeias de ácidos graxos na porção hidrofóbica. São produzidos como uma mistura de homólogos que diferem entre si pelo número de ramnoses e pelo tamanho da cadeia de ácidos graxos (LANG e WULLBRANDT, 1999).

Os homólogos de maior predominância nas misturas de ramnolipídeos são os mono-ramnolipídeos, formados por uma ramnose ligada a duas moléculas de ácido β-hidroxidecanóico; e os di-ramnolipídeos, formados por duas ramnoses ligadas a duas moléculas de ácido β-hidroxidecanóico (Figura 2.10) (LANG e WULLBRANDT, 1999 *apud* MAGALHÃES, 2012; NITSCHKE, COSTA e CONTIERO, 2010).

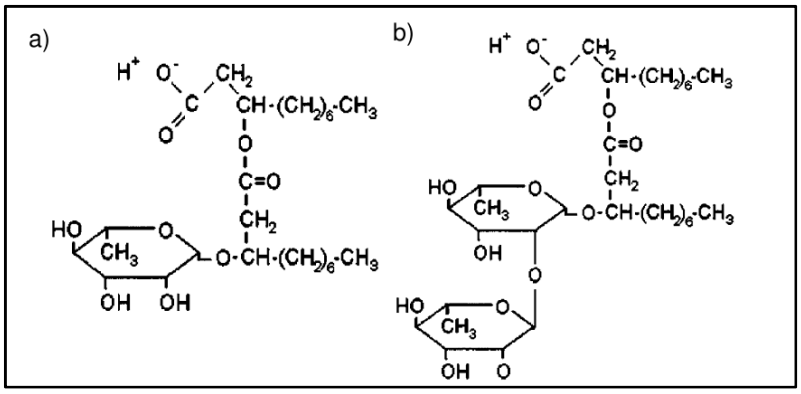


Figura 2.10: Estrutura química de mono-ramnolipídeo (a) e di-ramnolipídeo (b) (NGUYEN *et al*., 2008).

Cerca de 60 compostos e homólogos de ramnolipídeos já foram relatados, conforme revisado por Abdel-Mawgoud, Lépine e Déziel (2010). Este biossurfatante pode diminuir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 20-30 mN/m, em concentrações de 10-200 mg/L e diminuir a tensão interfacial de sistemas óleo/água para valores abaixo de 1 mN/m (LANG e WULLBRANDT, 1999). Acima da concentração micelar crítica (CMC) os ramnolipídeos formam micelas, vesículas ou lamelas, contudo os valores da CMC podem variar segundo a composição de homólogos da mistura, já tendo sido relatados valores entre 5-200 mg/L (NITSCHKE, COSTA e CONTIERO, 2010 *apud* MAGALHÃES, 2012).

Devido à alta biodegradabilidade e baixa toxicidade, os biossurfatantes do tipo ramnolipídeo são de grande interesse para a indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e para a área ambiental (MAIER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). Na área ambiental, os ramnolipídeos são utilizados, por exemplo, na biorremediação de poluentes insolúveis, uma vez que podem auxiliar a emulsificação dos contaminantes orgânicos tornando-os pseudossolubilizados (BANAT *et al*., 2010).

2.5.3 **Produção de biossurfatantes**

Os biossurfatantes são produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de micro-organismos em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes, o que inviabiliza a produção em larga escala, devido ao custo dos substratos (KRONENBERG *et al*., 2008; BOGNOLO, 1999). No entanto, substratos mais baratos e solúveis em água, como a glicose, glicerol e etanol, têm sido utilizados como alternativa. Na busca por um processo mais econômico para produção de biossurfatantes, efluentes industriais e resíduos agrícolas estão sendo utilizados como opções de matérias-primas (DESAI e BANAT, 1997 *apud* KRONENBERG *et al.*, 2008).

A quantidade e qualidade dos biossurfatantes produzidos pelas diversas espécies de micro-organismos são influenciadas tanto pela fonte de carbono quanto pelas concentrações de nitrogênio, fósforo, manganês e ferro no meio, além das condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995).

A produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 foi avaliada por Santa'Anna *et al*. (2002) utilizando como substrato n-hexadecano, petróleo, óleo de babaçu e glicerol, obtendo 130, 260, 200 e 690 mg/L de ramnose, respectivamente. O alto valor obtido com glicerol era esperado, já que esta fonte de carbono é solúvel, sendo facilmente degradada pelos micro-organismos quando comparada com os demais substratos. Quanto à fonte de nitrogênio, o nitrato de sódio foi a que apresentou melhores resultados quando comparada com uréia e sulfato de amônio.

Mitchell, Ramos e Krieger (2007) estudaram a produção de biossurfatante do tipo ramnolipídeo por bactérias *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, isoladas em campos petrolíferos do Nordeste Brasileiro, por fermentação em estado sólido utilizando como substratos sólidos farelo de algodão, canola, girassol, soja e bagaço de cana-de-açúcar/farelo de girassol (1:1), enriquecidos com solução de sais e glicerol. A produção de ramnolipídeos foi de 12,5 g/kg de substrato seco (expressa em ramnose) após 12 dias de cultivo quando se utilizou a mistura de bagaço de cana-de-açúcar/farelo de girassol (1:1) como substrato sólido. As propriedades físico-químicas do biossurfatante presente no extrato purificado do material fermentado foram examinadas por tensiometria com valores de concentração micelar crítica (CMC) de 14,3 mg/L. Resultados que confirmam a viabilidade de diferentes aplicações, sobretudo as ambientais, de biossurfatantes produzidos por FMS usando resíduo agroindustrial de baixo custo.

O Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) da UFRJ, em convênio com o CENPES/Petrobras, vem desenvolvendo, desde 2000, diversos trabalhos de produção de ramnolipídeos utilizando uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* PA1, oriunda da coleção de culturas do CENPES/Petrobras, que foi isolada de poços de petróleo. A otimização do meio de cultivo, busca de fontes de carbono de baixo custo e modificações no modo de condução do processo fermentativo levaram à minimização (900%) da produção de fatores de virulência de natureza protéica, com concomitante aumento da produção de ramnolipídeo (SANTOS *et al.*, 2002; SANTA ANNA *et al.*, 2002). O mesmo grupo desenvolveu trabalhos de escalonamento da produção deste biossurfatante, contornando o problema de formação de espuma, em biorreatores acoplados a membranas oxigenados de modo não dispersivo. O processo conduzido em batelada alimentada de glicerol/nitrato em altas relações C/N conduziu a um aumento de produtividade volumétrica e da produção de ramnolipídeo, e foi escalonado para biorreatores piloto de 200 L (FREIRE *et al.*, 2009; KRONEMBERGER *et al.*, 2008).

2.6 APLICAÇÃO DE BIOSSURFATANTES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Diversos pesquisadores, dentre os quais pode-se citar Millioli *et al.* (2009), Santa Anna *et al.* (2007), Rahman *et al.* (2003), Nitschke e Pastore (2002), e Alexander (1999), entre outros, vêm investigando a utilização de biossurfatantes no tratamento de água e solo contaminados por petróleo e seus derivados.

Zhang *et al.* (2009a) estudaram a adição de solução aquosa de ramnolípideo na forma de um caldo de cultura livre de células de *Pseudomonas aeruginosa* (biossurfatante – caldo bruto) em sistemas de lodos ativados para o tratamento aeróbio de óleo de fritura residual. Este tratamento foi realizado em escalas de bancada e piloto, sendo a eficiência da remoção de óleo de fritura determinada por análise da concentração de O&G e da demanda química de oxigênio (DQO). As concentrações de ramnolípideo variaram de 22,5 a 90 mg/L, sendo o tempo de retenção hidráulica de 30 h, em escala de bancada, suficiente para remover mais de 93% de O&G, enquanto que no sistema controle (sem adição de biossurfatante) a redução máxima foi de 10%. Já em escala piloto, a maior eficiência do tratamento com a adição do biossurfatante foi de aproximadamente 95%, com tempo de retenção hidráulica de 12 h, enquanto o tratamento controle alcançou uma eficiência de 17%. A espuma e a biodegradabilidade do biossurfatante utilizado no estudo também foram examinadas. Não foi

observada a formação de espuma nas duas primeiras horas, quando se utilizou a concentração de 22,5 mg/L de ramnolipídeo; nas demais concentrações do teste (dobro e triplo da CMC) a formação de espuma foi observada por um curto intervalo de tempo. A biodegradabilidade do ramnolipídeo foi comprovada através das medidas da tensão superficial. Os autores concluíram que a adição de biossurfatante (caldo de cultura contendo ramnolipídeo) mostrou grande potencial para o tratamento de águas residuárias oleosas por lodos ativados.

Nakhla *et al.* (2003) estudaram o efeito da adição do biossurfatante "*BOD-Balance*™" no tratamento anaeróbio de efluente com elevado teor de O&G, de uma indústria de ração animal. Os testes foram realizados em bateladas, adicionando-se o biossurfatante no efluente bruto e no efluente após uma etapa de flotação. Ao efluente bruto, foi adicionada apenas a concentração de 500 mg/L do biossurfatante, sendo a DQO inicial, total e solúvel, igual a 31440 mg/L e 11200 mg/L, respectivamente. Já ao efluente que passou pela etapa de flotação, três condições foram avaliadas: 250 mg/L, 100 mg/L e sem biossurfatante, apresentando como DQO total inicial de 17560, 15560 e 15800 mg/L, respectivamente, e DQO inicial solúvel de 6680, 8488 e 8520 mg/L, respectivamente. Todos os experimentos foram conduzidos a 35ºC, sem agitação. Como resultado, os autores afirmam que a adição do biossurfatante ao efluente bruto reduziu a DQO total em 63%, contra 34% do controle, e a DQO solúvel em 73%, contra 37% do controle, indicando o efeito positivo do biossurfatante como auxiliar na redução da DQO. Já ao efluente pré-tratado por flotação, a adição do biossurfatante não apresentou diferença significativa, sendo a redução da DQO total de 44, 48 e 48% para as adições de 250, 100 e nula, respectivamente; e redução da DQO solúvel de 84, 85 e 85%, respectivamente.

2.7 APLICAÇÃO CONJUNTA DE ENZIMAS E BIOSSURFATANTES NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

A aplicação conjunta de enzimas e biossurfatantes no tratamento de efluentes é uma abordagem inédita. Os biossurfatantes podem facilitar a biodegradação de óleos e gorduras principalmente por meio do aumento da sua solubilidade, emulsionando os triglicerídeos, facilitando a ação de enzimas e assim eliminando a necessidade de processos de pré-tratamento adicionais para remover gorduras, e resultando em custos de operação mais baixos (DAMASCENO, CAMMAROTA e FREIRE, 2012).

Chatterjee *et al.* (2009) estudaram a pré-emulsificação de óleo de girassol pela adição de surfatante (Triton X100) e de biossurfatante (ramnolipídeo) visando o aumento da atividade hidrolítica de lipase comercial proveniente de *Aspergillus niger* imobilizada em fibras de seda. A atividade hidrolítica foi 25,9% maior quando utilizado o ramnolipídeo como agente emulsificante (48,73 ± 1,26 U e 36,11 ± 0,96 U quando o óleo de girassol foi emulsionado na presença do ramnolipídeo e Triton X100, respectivamente).

Zhang *et al.*(2009b) investigaram o efeito estimulador da adição de biossurfatante do tipo ramnolipídeo proveniente de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 na ação das celulases produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* ZM4-F3, na hidrólise da palha de arroz. A adição do ramnolipídeo aumentou a atividade da enzima β-glucosidase em 5,32 U (unidades), ficando 115,3% maior do que a atividade da amostra controle. As celulases produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* apresentaram maior estabilidade após adição do biossurfatante, o que foi considerado pelos autores como outro efeito benéfico da ação do ramnolipídeos na hidrólise da palha do arroz.

Matsumiya *et al.* (2007) isolaram a bactéria *Burkohlderia sp*. DW2-1 de um solo contaminado com óleo. Os autores observaram a emulsificação dos lipídeos nas culturas e decidiram avaliar não somente a atividade lipásica como também a atividade biossurfatante da bactéria (sendo uma unidade definida como uma área clara de 1 cm^2 formada pela adição de 50 µl do sobrenadante do cultivo no centro de uma placa de Petri contendo 20 mL de água destilada e 50 µl de um óleo pesado). Os estudos mostraram maior atividade lipásica (1720 U/L) para a cepa DW2-1 contra 7 U/L de uma enzima comercial (*BN clean*), após 48h de cultivo. A atividade biossurfatante da bactéria foi de 480 U/ml quando suplementada com óleo de salada e 148 U/ml sem suplementação, contra 10 U/ml da enzima comercial. Após este estudo, os autores utilizaram a cepa DW2-1 para o pré-tratamento de efluente industrial contendo 10 g/L de óleo de salada. Após incubação de 24h, este teor reduziu para 1,8 g/L, e a concentração final de lipídeos no biorreator aeróbio foi menor que 1 g/L após três dias de operação, concluindo que esta bactéria pode ser utilizada na degradação de alto teor de lipídeos sem afetar o consórcio microbiano.

2.8 ANÁLISE ECONOMICA

2.8.1 **Escolha do software de apoio: SuperPro Designer**

O mercado comercializa vários programas de simulação de processo, mas somente alguns destes são apropriados para processos biotecnológicos. Um número ainda menor combina a capacidade de simulação com sequenciamento de processos paralelos dentro do mesmo processo (RAICHER, 2011).

O *ExtendSim*, comercializado pela Imagine That Inc., oferece um ambiente de simulação para bioprocessos em batelada. É a versão mais básica em termos de possibilidades, por apresentar um custo compatível, sendo mais usado em ambientes acadêmicos do que por empresas (RAICHER, 2011).

A *Aspen Technology* (*Advanced System for Process Engineering*) oferece simuladores de processo desde 1981, com um sistema acoplado de avaliação econômica. O pacote ASPEN Plus para processos químicos criou um simulador dedicado para bioprocessos, que foi depois substituído pelo *Batch Plus*, um ambiente de simulação baseado em processos em batelada (RAICHER, 2011).

A *Biopharm Services* oferece um software denominado *BioSolv*, uma ferramenta baseada em Microsoft Office Excel, que pode ser utilizada para simulação de custos e de processo. O programa foi projetado para processos biofarmacêuticos (RAICHER, 2011).

Já o *SuperPro Designer* é um software de simulação de processo composto por uma série de algoritmos, capazes de modelar matematicamente o desempenho das operações unitárias de um processo produtivo em termos de simulação e opções de avaliação econômicas, incluindo modelos utilizados em tratamento de águas residuárias e outras aplicações de controle de poluição (por exemplo, reatores de tratamento biológicos, clarificadores, unidades de tratamento de lodo, unidades de controle de poluição do ar, etc.) (BERGS *et al*., 2003).

O *SuperPro Designer* da *Intelligen* combina a definição de processo, capacidade de cálculo e sequenciamento em um programa a um preço acessível para pequenas e médias indústrias. Oferece, ainda, um banco de dados padrão ou a opção de customização de um banco de dados para registrar equipamentos e utilidades nas quantidades disponíveis (RAICHER, 2011).

Este *software* realiza balanços de massa e energia, estima tamanhos de equipamentos e custo de compra. É de fácil operação, equipado com um avaliador econômico capaz de gerar um relatório econômico detalhado sem a necessidade de exportar dados para outra ferramenta com o objetivo de realizarem-se os cálculos de análise de custos (ROUF, 1999).

Pelos dados apresentados, verifica-se que a aplicação conjunta de biossurfatantes e enzimas no tratamento de efluentes é um campo novo e promissor, com poucos trabalhos divulgados na literatura. A combinação de ramnolipídeo e lipase se baseia em uma melhor disponibilização dos lipídeos para a reação enzimática, podendo-se aumentar a eficiência de hidrólise com custos mais competitivos para o tratamento de efluentes. Assim, este estudo pretende avaliar que combinação lipase/ramnolipídeo resulta em um tratamento anaeróbio mais eficiente em termos de redução de DQO e produção de metano e se os custos para tal são economicamente viáveis em comparação aos processos convencionais de tratamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO TRABALHO

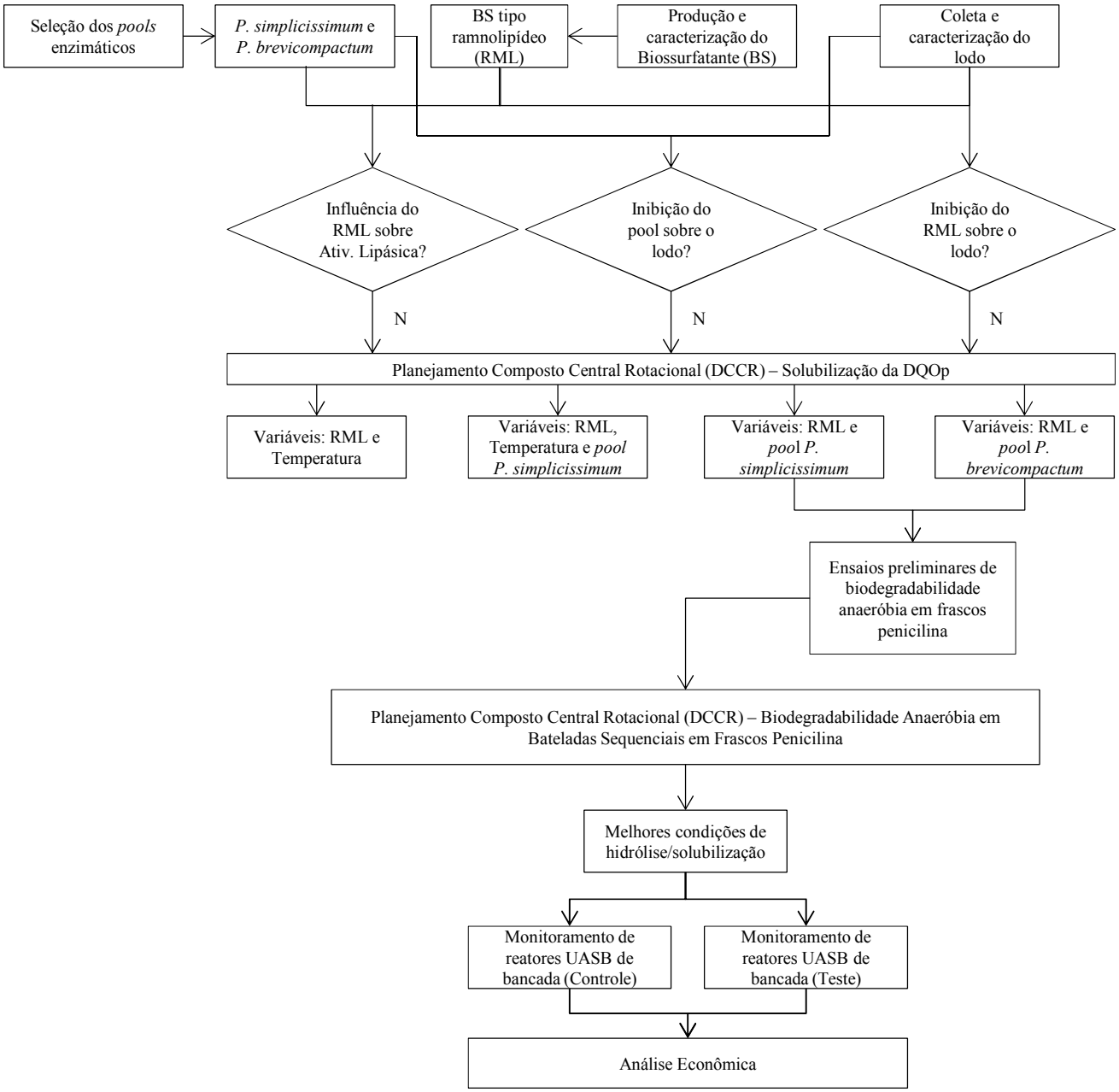


Figura 3.1: Fluxograma das etapas executadas durante o trabalho

3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1 **Atividade lipásica**

A atividade lipásica foi determinada utilizando-se uma emulsão composta por 5% (m/v) de óleo de oliva emulsionado por 3 minutos com 5% (m/v) de goma arábica em tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,0). Em 19 mL desta emulsão adicionava-se 1 mL do preparado enzimático, sendo este material incubado a 35ºC por 20 minutos a 200 rpm. A reação era interrompida pela adição de uma solução de acetona:etanol (1:1 v/v), para extração dos ácidos graxos liberados. Os ácidos graxos foram titulados em titulador automático até pH 11,0, com solução de NaOH 0,04 mol/L. Os brancos reacionais foram obtidos adicionando-se o preparado enzimático antes da titulação. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio (FREIRE *et al*., 1997, *apud* GUTARRA, 2007), sendo determinada pela equação 3.1:

$$A = \frac{(V - V_b).m.1000}{t.Ve} \tag{3.1}$$

Onde:

A = atividade lipásica (U/mL)

V = volume de solução de NaOH gasto na titulação da amostra

V_b = volume de solução de NaOH gasto na titulação do branco (ml)

m = concentração da solução de NaOH (milimoles/ml)

t = tempo de reação (minutos)

V_e = volume de extrato enzimático (ml)

A atividade lipásica por grama (U/g) foi calculada pela multiplicação da atividade enzimática no extrato líquido (U/ml) pelo volume de tampão utilizado na extração e divisão pelo peso seco da torta fermentada.

3.2.2 **Atividade proteásica**

Em tubos *eppendorf* foram adicionados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de solução de azocaseína (0,5% m/v) preparada, no momento de uso, em tampão universal, pH 5,0. Esta mistura foi então incubada em banho-maria a 40ºC, durante 5 minutos. Após este período, era adicionado 1 mL de solução HCl 1 mol/L em cada tubo para paralisar a reação. Os tubos foram então centrifugados a 11000 rpm, durante 1 minuto, e a absorbância dos sobrenadantes lida a 345 nm em espectrofotômetro (BENDICHO *et al.*, 2002). A atividade enzimática (U) foi definida como o aumento no número de unidades de absorbância por minuto, conforme apresentado na equação 3.2 (CHARNEY e TOMARELLI, 1947). Cada análise era realizada em triplicata.

$$A = \frac{abs * diluição}{t * Ve} \tag{3.2}$$

Onde:

A = atividade (U/mL)

Abs = valor de absorbância da análise

Diluição = diluição da amostra em tampão universal

t = tempo de reação enzimática

Ve = volume de extrato enzimático

3.2.3 **Índice de emulsificação**

A atividade emulsificante foi determinada de acordo com o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). O teste consiste em adicionar n- hexadecano ao caldo fermentado e agitar a mistura em vórtex por dois minutos. A emulsão formada foi então deixada em repouso por 24 horas, em temperatura ambiente. O Índice de Emulsificação, em percentual, corresponde à razão entre altura da camada emulsionada e a altura total do líquido, conforme apresentado na equação 3.3 a seguir.

$$E = \frac{H_{em}}{H_t} * 100 \tag{3.3}$$

Sendo:

E = Índice de Emulsificação (%)

H_{em} = Altura da Camada Emulsionada (mm)

H_t = Altura Total de Líquido (mm)

3.2.4 **Tensão superficial e concentração micelar crítica**

A determinação da tensão superficial (mN/m) do extrato bruto foi realizada em um tensiômetro Aqua-Pi (Kibron Inc., Helsinki), a 25 ºC. As medições de tensão superficial foram baseadas no método Du Nouy, utilizando sondas de pequeno porte. Todas as amostras foram preparadas com água pura. Antes de cada experimento, o instrumento foi calibrado medindo-se a tensão superficial da água pura. As medidas foram repetidas até que as variações de tensão de superfície a partir de três leituras sucessivas permanecesse dentro de ± 0,2 mN/m.

A concentração micelar crítica (CMC) foi calculada através da determinação da tensão superficial do caldo fermentado diluído. Os valores de tensão superficial versus os valores relativos à diluição resultam em uma curva descendente que tende à estabilidade. O ponto no qual a curva torna-se constante corresponde à CMC (ROBERT *et al*., 1991; DUVNJAK *et al*., 1982; COOPER, ZAJIC e GERSON, 1979).

3.2.5 **pH**

O pH das amostras foi medido por leitura direta em potenciômetro (Quimis, Q400AS).

3.2.6 **Demanda química de oxigênio**

Na determinação da DQO foi empregado o método colorimétrico padrão de refluxo fechado (Hach), 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 são diluídas (quando necessário) de forma adequada para as faixas de DQO contempladas pelo método. Logo em seguida foram adicionadas as soluções para o ensaio, sendo os tubos colocados no

digestor Hach a 150ºC durante 2 horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, era realizada a leitura direta da absorbância em espectrofotômetro (Hach, DR 5000). Os brancos foram preparados com água destilada substituindo as amostras. Os valores de absorbância a 600 nm foram convertidos em DQO através de uma curva padrão previamente preparada utilizando-se biftalato ácido de potássio como substância padrão (APHA, 2005).

Na determinação da DQO solúvel as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose de tamanho de poro de 0,45 µm e só então eram diluídas, sendo o protocolo citado acima executado.

3.2.7 **Sólidos suspensos e dissolvidos, totais, fixos e voláteis**

A determinação dos sólidos suspensos totais, fixos e voláteis foi realizada com amostras filtradas em filtros de fibra de vidro, com porosidade de 1,2 µm, sob vácuo, e o resíduo retido nos mesmos colocados em cápsulas de porcelana previamente taradas (secas em mufla durante 30 minutos e resfriadas em dessecador) (P1). Os conjuntos (cápsulas e filtros contendo amostra) eram aquecidos em estufa a 105º C até peso constante (P2). Após esta etapa, eram levados a mufla a 550ºC por 30 minutos, resfriados e pesados (P3). As concentrações de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram calculadas pelas equações a seguir (APHA, 2005).

$$SST = \frac{(P_2 - P_1).10^6}{V_a} \tag{3.4}$$

$$SSF = \frac{(P_3 - P_1).10^6}{V_a} \tag{3.5}$$

$$SSV = \frac{(P_2 - P_3).10^6}{V_a} \tag{3.6}$$

Sendo:

SST = sólidos suspensos totais (mg/L)

SSF = sólidos suspensos fixos (mg/L)

SSV = sólidos suspensos voláteis (mg/L)

P_1 = peso da cápsula vazia (g)

P_2 = peso do conjunto (cápsula + filtro com resíduo) após estufa (g)

P_3 = peso do conjunto (cápsula + filtro com resíduo) após mufla (g)

V_a = volume de amostra (ml)

Procedimento similar foi adotado para a quantificação de sólidos dissolvidos totais (fixos e voláteis), sendo substituído o filtro contendo a amostra suspensa, pelo volume permeado (amostra solúvel).

3.2.8 **Concentração de sólidos nos reatores**

Amostras de iguais volumes do lodo anaeróbio eram retiradas de amostradores distribuidos ao longo dos reatores (A2 e A3). Como o volume das seções era igual, as amostras foram misturadas e centrifugadas a 1200 g por 10 min, sendo o sobrenadante descartado e os sólidos transferidos para cápsulas de porcelana, realizando procedimento similar ao descrito em 3.1.7. Com as concentrações de sólidos voláteis suspensos obtidas no lodo dos reatores e os volumes das respectivas seções, calculou-se a massa de biomassa presente nos mesmos, através do somatório das massas de cada seção, de acordo com as equações 3.7 e 3.8.

Quantidade de biomassa (M) em cada reator:

$$Mr = Cn * Vn \tag{3.7}$$

Concentração média da biomassa no reator (Cr):

$$Cr = \frac{Mr}{Vr} \tag{3.8}$$

Sendo:

Cn = concentração de sólidos voláteis em suspensão (kg SVS/m^3)

Vn = volume correspondente a seção amostrada do reator (m^3)

Mr = quantidade de biomassa na seção amostrada do reator (kg SVS)

Vr = volume útil total do reator (m^3)

Cr = concentração média de biomassa no reator (kg SVS/m^3)

3.2.9 **Óleos & Graxas (O&G)**

A determinação da concentração de O&G no efluente foi realizada através de extração em Soxhlet, utilizando hexano como solvente, de acordo com procedimento padrão (APHA, 2005). As amostras dos efluentes são acidificadas com 5 ml/L de HCl diluído (1:1 v/v) e filtradas em disco de papel de filtro Whatman número 4, coberto com uma camada de diatomita, obtida pela filtração de uma suspensão aquosa (5% m/v) de terra diatomácea. As amostras preparadas foram colocadas dentro de um cartucho de extração previamente descontaminado pela extração com hexano por 2 horas. Os cartuchos com as amostras foram colocados para secar em estufa a 105°C por 30 minutos. A análise era realizada utilizando-se balões limpos com pérolas de vidro, previamente tarados após secagem a 105°C e resfriamento em dessecador, obtendo-se P1. Em cada balão foram colocados 200 mL de hexano, sendo estes conectados ao extrator Soxhlet contendo o cartucho com a amostra. A extração com hexano era realizada a uma velocidade de 20 ciclos por hora durante 4 horas. Após esse período, o hexano foi evaporado em rotoevaporador e o balão contendo os resíduos oleosos, colocado para secar em estufa a 70°C até peso constante e, após resfriamento, pesado obtendo-se P2. A concentração de O&G no efluente foi calculada pela equação 3.9 a seguir.

$$O\ \&\ G = \frac{(P_2 - P_1).10^6}{Va} \tag{3.9}$$

Onde:

O&G = concentração de óleos e graxas (mg/L)

P_1 = peso do balão + pérolas de vidro (g)

P_2 = peso do balão + pérolas de vidro + resíduo gorduroso (g)

Va = volume da amostra filtrada (ml)

O teor de O&G do lodo dos biorreatores foi determinado com base no peso seco (SST) do mesmo. Para a determinação do teor de óleos e graxas no lodo colocava-se 5,0 mL de lodo em um tubo de centrífuga previamente tarado e este era centifugado por 10 min a 3000 rpm. O lodo úmido era, então, pesado e para cada g de lodo adicionava-se 1,0 g de $MgSO_4.7H_2O$. A mistura formada foi seca à temperatura ambiente até a solidificação. Posteriormente, esta mistura foi triturada e seu conteúdo transferido para um disco de papel Whatman nº 4 que, por

sua vez, foi acondicionado em cartucho de extração. A extração dos óleos e graxas foi realizada de acordo com a metodologia descrita para amostras líquidas (APHA, 2005). O teor de óleos e graxas no lodo dos reatores foi determinado de acordo com a equação 3.10:

$$O\&G = \frac{(P_2 - P_1)}{Su.A} \tag{3.10}$$

Sendo:

O&G = concentração de óleos e graxas (%)

P1 = peso do balão vazio (g)

P2= peso do balão + resíduo (g)

Su= peso dos sólidos úmidos (g)

A= fração de sólidos secos (%)

3.2.10 **Nitrogênio total**

A determinação do nitrogênio total foi realizada utilizando-se um analisador de nitrogênio modelo TNM-1 Shimadzu. O monóxido de nitrogênio foi medido pelo método de quimiluminescência e as medições podiam ser efetuadas na faixa de 0,1 a 4000 mg/L. Aliquotas de 100 mL de amostra eram separadas, filtradas em membranas com porosidade igual a 0,45 nm e levadas imediatamente ao analisador.

3.2.11 **Fósforo total**

A determinação da concentração de fósforo total foi realizada pela digestão de 100 mL da amostra em balão Kjeldahl contendo 1 mL de H_2SO_4 concentrado e 5 mL de HNO_3 concentrado, sob aquecimento, até a completa liberação de fumos de NO e SO_2. Após o resfriamento, foram adicionados 20 mL de água destilada e quantidade suficiente de solução de NaOH 1 mol/L para o ajuste do pH para 7,0. A amostra era avolumada a 100 mL e, posteriormente, 35 mL desta solução foram adicionados a balão volumétrico de 50 mL juntamente com 10 mL do reagente vanadato-molibdato. Após completar o volume com água destilada e aguardar 10 minutos, a leitura da absorbância era realizada em espectrofotômetro a

490 nm. O branco reacional era preparado pela adição de água no lugar da amostra e uma curva-padrão foi elaborada com solução padrão de KH_2PO_4 (APHA, 2005). A concentração de fósforo total foi calculada pela equação 3.11 a seguir.

$$PT = \frac{Abs_a*100*50}{\alpha*V_a*35} \quad (3.11)$$

Sendo:

PT = fósforo total (mg/L)

Abs_a = absorbância da amostra

α = coeficiente angular da curva padrão

V_a = volume de amostra (mL)

3.2.12 **Alcalinidade total – Método Potenciométrico (Ripley *et al.*, 1986)**

A metodologia utilizada neste trabalho foi descrita por Ripley *et al*. (1986) e consiste na centrifugação das amostras por 3 minutos a 1500 rpm. Em seguida, 50 mL da amostra eram transferidos para um bécher de 100 mL e o pH era medido e levado até 5,75 com adição de H_2SO_4 0,01N, anotando-se este valor (V1). Esta alcalinidade é denominada parcial, podendo ser aproximada à alcalinidade a bicarbonato, uma vez que compreende 80% de bicarbonato e 20% de sais de ácidos orgânicos voláteis. Continuava-se a titulação com H_2SO_4 0,01N até pH 4,3, anotando-se o volume (V2). Esta alcalinidade é denominada intermediária, podendo ser aproximada àquela devida a sais de ácidos voláteis. A alcalinidade total é o somatório das alcalinidades parcial e intermediária (V3 = V1 + V2), calculada pela equação 3.12 a seguir:

$$A\ total = \frac{V_3 \times N_{H2SO4} \times 50000}{V\ amostra} \quad (3.12)$$

Sendo:

A total = Alcalinidade Total em mg $CaCO_3$/L

V_3 = Somatório dos volumes de H_2SO_4 gastos nas titulações da alcalinidade parcial e intermediária

N_{H2SO4} = Normalidade do ácido sulfúrico diluído utilizado na titulação

V amostra = Volume de amostra utilizada em mL.

3.2.13 **Ácidos voláteis totais**

A determinação dos ácidos voláteis totais era realizada de acordo com método descrito por DiLallo e Albertson (1961), que consistia em reduzir o pH da amostra utilizada para determinação da alcalinidade total de 4,30 para 3,30 com H_2SO_4 0,005 M e então levar à fervura durante 3 minutos, para remover o dióxido de carbono da solução. Após fervura, a amostra era resfriada em banho de água até temperatura ambiente e então era realizada a titulação com solução padronizada de NaOH 0,005 M até pH 4,00, desprezando-se esse volume; continuava-se a titulação da amostra (pH=4,0) com solução padronizada de NaOH 0,005 M até pH 7,0 e anotava-se o volume (V). Esta adição permitia a neutralização de principalmente ácidos orgânicos, sendo a acidez volátil total calculada através da equação 3.13:

$$Av = \frac{V \times N_{NaOH} \times 60.000}{V_{amostra}} \tag{3.13}$$

Sendo:

Av = Ácidos Voláteis Totais em mg/L como ácido acético.

V = Volume de NaOH utilizado na titulação da amostra entre pH 4 e 7.

$V_{amostra}$ = Volume da amostra utilizada para análise

Porém, o fator de conversão para determinar os ácidos voláteis presentes, a partir da alcalinidade, dependia da quantidade de ácidos que era titulada entre pH 4,0 e 7,0. O pH de equilíbrio de ácidos orgânicos é menor que 4,0, mas variável com a concentração de ácidos. Além disso, o pH final de titulação de ácidos fracos com base forte é sempre maior que 7,0. Logo, experimentalmente, DiLallo e Albertson (1961) observaram a relação 1,5 para a alcalinidade superior a 216 mg/L e relação 1,0 para valores inferiores. A existência desses dois fatores se deve à influência mais significativa da alcalinidade denominada básica para valores menores de alcalinidade total. Portanto, o valor da acidez total era corrigido, se

necessário, de acordo com a alcalinidade total da amostra, conforme apresentado nas equações 3.14 e 3.15, a seguir:

Caso 1: Alcalinidade total maior que 216 mg/L

$$AVT = Av \times 1,5 \tag{3.14}$$

Caso 2: Alcalinidade total menor ou igual a 216 mg/L

$$AVT = Av \times 1,0 \tag{3.15}$$

Sendo:

AVT = Ácidos Voláteis Totais, em mg HAc/L

Av = Ácidos Voláteis Totais em mg/L como ácido acético, determinados na análise de Ácidez Volátil, sem levar em consideração a influência da alcalinidade da amostra.

3.2.14 **Volume e composição do biogás**

Nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia, seringas plásticas graduadas de 10, 20 e/ou 60 mL conectadas aos frascos tipo penicilina permitiram quantificar o volume de biogás produzido por deslocamento do êmbolo das mesmas. No biorreator anaeróbio o volume de biogás foi medido através de medidor *"MilliGascounter*", da Ritter. Em ambos, a composição do biogás foi analisada por cromatografia gasosa em cromatógrafo VARIAN MICRO GC 4900. O biogás produzido era recolhido em ampolas gasométricas e injetado diretamente no cromatógrafo. As condições utilizadas na cromatografia foram:

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 – 1,5 minutos

3.2.15 **Atividade Metanogênica Específica (AME)**

A Atividade Metanogênica Específica (AME) pode ser definida como a capacidade máxima de produção de metano por um consórcio de micro-organismos anaeróbios, realizada em condições controladas (CHERNICHARO, 2007). O teste foi conduzido em frascos tipo penicilina de 100 mL, com 10 % de "*headspace*", sem agitação, a 30ºC, por 14 dias, tendo como concentração inicial de lodo anaeróbio 2,0 g STV/L e como concentração de substrato (mistura de ácidos orgânicos voláteis – acético, propiônico e butírico) 2,0 g DQO/L, de acordo com Rocha *et al*.(2001). O volume de biogás produzido foi medido pelo deslocamento do embôlo de seringas de 20 mL, conectadas aos frascos testes. Desta forma, a partir de quantidades conhecidas de biomassa (g SVS) e substrato (g DQO), e sob condições padronizadas, pode-se avaliar a produção de metano ao longo do período de teste. A AME é calculada a partir das taxas de produtividade máxima de metano (mL CH_4/g SVS.h ou g DQO_{CH4}/g SVS.d). A conversão de mL CH_4 em g DQO_{CH4} é feita de acordo com as seguintes equações (CHERNICHARO, 2007):

$$V_{CH4} = \frac{DQO_{CH4}}{K(t)} \tag{3.16}$$

Sendo:

V_{CH4} = volume de metano produzido (L);

DQO_{CH4} = carga de DQO removida no reator e convertida em metano (g DQO);

K(t) = fator de correção para a temperatura operacional do reator (g DQO/L).

$$K(t) = \frac{P * K}{R * (273 + t)} \tag{3.17}$$

Sendo:

P = pressão atmosférica (1 atm);

K = DQO correspondente a um mol de CH_4 (64 gDQO/mol);

R = constante dos gases (0,08206 atm.L/mol.°K);

t = temperatura operacional do reator (°C).

3.2.16 **Análises moleculares para caracterização da diversidade microbiana**

As análises foram realizadas no Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), sob orientação da Dra. Marcia Teresa Soares Lutterbach.

3.2.16.1 Preservação das amostras e extração de DNA

Eram coletados 10 ml de amostra do leito de lodo (amostrador 2) dos biorreatores UASB e colocados em um tubo do tipo Falcon. As amostras foram lavadas com tampão PBS, centrifugadas a 6000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido 3 vezes, sendo o *pellet* obtido armazenado a -20º C até a realização da extração do DNA (GRIFFITHS *et al*., 2000).

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o "*Fast DNA® Kit SPIN* da Bio 101 (Califórnia, EUA), em conjunto com o *FastPrep®*, instrumento que possibilita a lise celular. As soluções e os microtubos utilizados neste kit são fornecidos pelo fabricante.

Adicionava-se aproximadamente 0,5g de lodo ao *Lysing Matrix tube*, um tubo que o fabricante fornece que contém pérolas de vidro que, ao ser agitado no aparelho de *Fast Prep®*, realizava a lise física das células microbianas do lodo. O volume ocupado não excedia 7/8 do total, permitindo uma perfeita homogeneização, acrescentando 978 µL da solução "*Buffer Sodium Phosphate*" e 122 µL da solução "*MT Buffer*", soluções tampões responsáveis por manter o pH próximo de 8,0, preservando assim o material genético. Os tubos eram colocados no *Fast Prep®* e processados por 10 minutos a uma velocidade de 5,5 m/s. Após este período eram centrifugados a 10000 g por também 1 minuto. O sobrenadante era então transferido para um tubo limpo (microtubo de 1,5 mL). Adicionava 250 µL do reagente PPS (responsável pela lise química) agitando manualmente (aproximadamente 10x), em seguida eram novamente centrifugados a 10000 g por 1 minuto para formação do pellet (precipitado) e o sobrenadante transferido para um tubo limpo de 15 mL, no qual era adicionado1 mL da suspensão do "*Binding Matrix Suspension*". Agitava-se manualmente por 2 minutos para permitir a ligação do DNA à matriz, deixando em repouso por 3 minutos para precipitação da matriz de sílica; 500 µL do sobrenadante eram retirados, descartando o restante. Ressuspendia- se a matriz no restante de sobrenadante que permanecia no tubo. Aproximadamente 600 µL da mistura eram transferidos para um tubo "*Spin Filter*" e

novamente centrifugado a 14.000 g por 1 minuto. Após centrifugação, 500 µL da solução "*SEW-M*" eram adicionados ao frasco, e novamente centrifugados a 10000 g por 1 minuto. Removia-se então o filtro e colocava-o em um "*Catch tube*" limpo, deixando secar por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionava 50 µL DES e homogeneizava-se cuidadosamente, tomando o cuidado para não perfurar o filtro, e mais uma centrifugação a 10.000 g por 1 minuto era executada, obtendo-se assim a extração do DNA do lodo.

3.2.16.2 Amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Os DNA obtidos a partir das amostras de lodo foram amplificados pela reação de polimerização em cadeia (PCR) (SAIKI *et al*., 1988) utilizando-se como par de iniciadores ("*primers*") homólogos a regiões conservadas do gene que codifica o rRNA 16S e apresentavam um grampo GC, necessário aos experimentos subseqüentes de DGGE (MUYZER e SMALLA, 1998). As sequências dos iniciadores e do grampo GC utilizados é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: *Primers* e grampo CG utilizados para ampliação dos DNA

Iniciadores	Sequência
U968f	5'AACGCGAAGAACCTTAC3'
L1401	5'GCGTGTGTACAAGACCC3'
Grampo GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG3'

Para a reação de amplificação do fragmento do DNAr 16S das bactérias foram utilizadas as seguintes soluções: 1,0 µl de Taq DNA polimerase (5U/µl); 5 µl de tampão PCR 10x; 7,5 µl de $MgCl_2$ (25mM); 10,0 µl de dNTP (10 mM); 1 µl do *primer forward* (10 µM) e 1 µl do *primer reverse* (10 µM) e 3 µl de DNA extraído, sendo levados ao equipamento *Mastercycler Gradient Eppendorf*.

A programação das condições utilizadas no aparelho para a amplificação do fragmento 16S do domínio Bacteria é apresentada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condições utilizadas para amplificação do fragmento 16S do domínio Bacteria

Domínio	Nº de ciclos	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
Bacteria	35	94ºC 3 min	94ºC 1min	55ºC 1 min	72ºC 1 min	72ºC 10 min

3.2.16.3 Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE foi realizada em gel de poliacrilamida com gradiente linear de desnaturantes variando de 45% a 75%, formados a partir de soluções-estoque de poliacrilamida (6%), preparados com 50 µl de perssulfato de amônia 10% (APS) e 10 µl de tetrametiletilenodiamina (temed). O gel ficou polimerizando durante 3 horas, em seguida as placas contendo o gel foram colocadas em um suporte apropriado e levado à cuba de DGGE. Em cada *slot* do gel era aplicada uma alíquota de cerca de 8 µl do produto de PCR misturada a 5 µl de corante para eletroforese de DNA. A aplicação das amostras no gel ocorria com os *slots* previamente preenchidos com tampão TAE 0,5X. A eletroforese é desenvolvida com 70 V a 60ºC por 16 horas. Após a corrida, o gel era retirado da placa e pode ser corado com brometo de etídio por 15 minutos, observado sob exposição da luz UV e fotografado por um sistema de captura de imagem *STORM* (Pharmacia, Amersham).

3.2.16.4 Estatística do DGGE

A análise estatística do gel de DGGE foi realizada através do pacote estatístico *Bionumerics Software 5.10* (Applied Math, Ghent, Bélgica). A comparação estatística dos perfis da comunidade bacteriana gerados para cada amostra foi avaliada através da utilização do coeficiente de Pearson e um dendrograma gerado com a utilização do coeficiente UPGMA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando melhor explanação do trabalho, os procedimentos, resultados e conclusões parciais de cada etapa serão abordados em conjunto, sendo este capítulo dividido de acordo com as etapas executadas.

4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS *POOLS* ENZIMÁTICOS

4.1.1 **Micro-organismos: origem, manutenção e propagação**

As cepas de *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium verrucosum* e *Penicillium brevicompactum* utilizadas neste trabalho foram isoladas da fermentação natural (FREIRE, 1996) de rejeitos do processamento da amêndoa de babaçu e selecionadas como produtoras de lipase (FREIRE, 1996, GUTARRA, 2003, SILVA *et al*., 2011). As cepas foram mantidas em glicerol (20%) e estocadas a –20°C.

As propagações foram realizadas a 30ºC, durante 7 dias, em meio com a seguinte composição (% m/v): amido solúvel 2,0; $MgSO_4.7H_2O$ 0,025; KH_2PO_4 0,05; $CaCO_3$ 0,5; extrato de levedura 0,1; óleo de oliva 1,0; e ágar 1,0. Após crescimento, os esporos eram então raspados, suspensos em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0) e contados em câmara de Neubauer (FREIRE, 1996).

4.1.2 **Produção dos *pools* enzimáticos**

Os preparados enzimáticos, neste trabalho denominados *pools* enzimáticos por conterem mais de uma enzima, como por exemplo lipases e proteases, foram produzidos através de fermentação em estado sólido (FES) de resíduo agroindustrial da produção de óleo de babaçu (denominado torta de babaçu) pelos micro-organismos *Penicillium simplicissinum, Penicillium verrucosum e Penicillium brevicompactum*, segundo metodologia descrita por Gutarra *et al*. (2005, 2007).

A torta de babaçu (meio basal) foi moída e peneirada de forma a se obter tamanhos de partículas com dimensões entre 0,21 e 0,42 mm, sendo armazenada a 4º C, até o momento de sua utilização.

As fermentações foram conduzidas em béqueres de polipropileno de 600 mL, contendo 15 gramas de torta e água suficiente para atingir 65% de umidade inicial. As tortas destinadas para a fermentação utilizando o fungo *P. simplicissimum* foram suplementadas com 6,25% (m/m) de melaço (C:N 12,8:1). Já as tortas destinadas para a fermentação utilizando o fungo *P. verrucosum* foram suplementadas com 2,00 % (m/m) de melaço (C:N 12,5:1). As fermentações do fungo *P. brevicompactum* ocorreram sem suplementação (C:N 12,3:1) (GUTARRA, 2005, 2007). Os béqueres eram então autoclavados a 1 atm por 15 minutos e após resfriamento, inoculados com suspensão de esporos previamente preparada até a concentração desejada de 1 X 10^7 esporos/g. As fermentações foram conduzidas a 30°C, durante 96 horas, em estufas com injeção de ar úmido com 95% de saturação.

Ao final de cada fermentação, toda massa fermentada era então misturada e alíquotas de 15 gramas em triplicatas, retiradas para medição das atividades lipásica e proteásica. Para extração enzimática eram adicionados 5 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) por grama de torta fermentada. O conjunto (*pool* e tampão) era levado a um agitador rotatório a 35ºC e 200 rpm por 20 minutos. Posteriormente, o rejeito fermentado foi prensado manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a 2000 g por 5 minutos para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação, em triplicatas, das atividades lipásica e proteásica. O restante da torta fermentada foi embalado à vácuo e armazenado em freezer (-20ºC) até o momento de sua utilização.

4.1.3 **Resultados e discussão**

Inicialmente foram realizadas duas fermentações em estado sólido com inóculos de cada micro-organismo em separado, a fim de se determinar o tempo de fermentação necessário para uma maior atividade lipásica. Os resultados em termos de atividade lipásica das duas primeiras fermentações são apresentados na Figura 4.1.

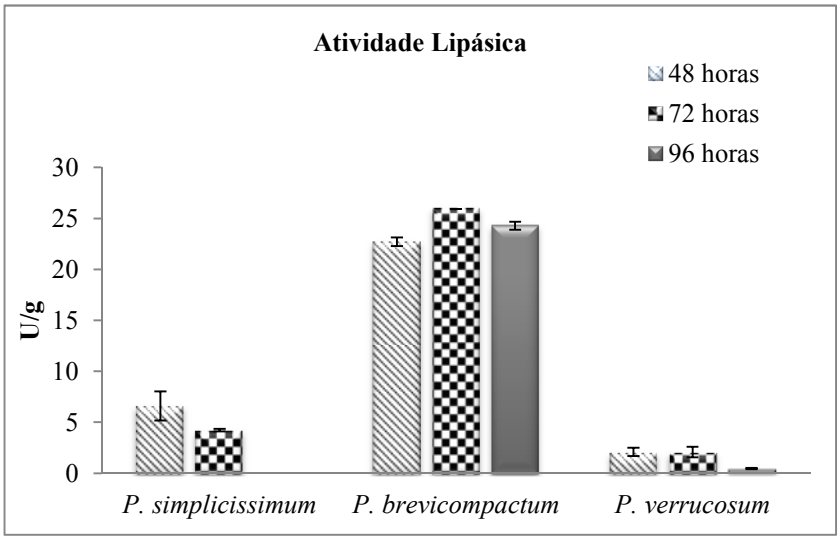


Figura 4.1: Atividades lipásicas nos meios inoculados com os fungos *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum* e *P. verrucosum*, nos tempos de 48, 72 e 96 horas.

O *pool* enzimático produzido pelo fungo *Penicillium verrucosum* apresentou baixa produção de enzima nos tempos estudados, o que o tornou inviável para a aplicação pretendida.

Já o *pool* enzimático produzido pelo fungo *Penicillium brevicompactum* apresentou atividade lipásica máxima em torno de 72 horas de fermentação (26 U/g), permanecendo praticamente constante até 96 horas de fermentação. O *pool* enzimático produzido pelo fungo *Penicillium simplicissimum* apresentou baixa atividade enzimática, com valor máximo de 6,6 U/g em 48 horas de fermentação, decaindo em seguida a este máximo. Este fato pode estar relacionado com a maior produção de proteases (cerca de 7 vezes maior) pelo fungo *Penicillium simplicissimum* em comparação ao *Penicillium brevicompactum*, como demonstrado na Figura 4.2. Uma maior produção de proteases leva à destruição da lipase produzida por proteólise, conforme observado em outros estudos (GUTARRA *et al.,* 2007; PALMA *et al.,* 2000; GOMBERT *et al.,* 1999).

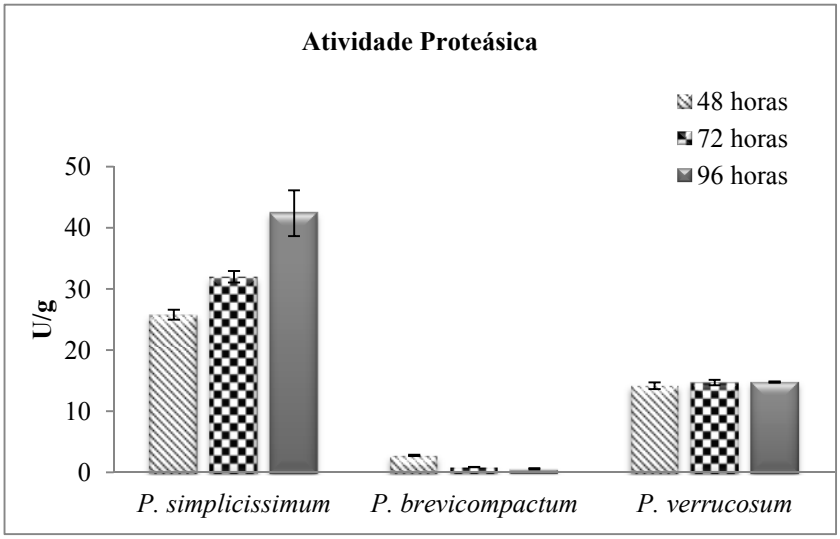


Figura 4.2: Atividades proteásicas nos meios inoculados com os fungos *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum* e *P. verrucosum*, nos tempos de 48, 72 e 96 horas.

De acordo com Gutarra *et al.* (2009), as lipases produzidas pelo fungo *P. simplicissimum* apresentam maior especificidade por substratos contendo ácidos graxos de cadeia média (C10 a C12). Os valores de atividade lipásica encontrados neste trabalho sugerem que as lipases produzidas pelo fungo *P. brevicompactum* apresentam especificidade por substratos contendo ácidos graxos de cadeia longa (maiores que C18), uma vez que na quantificação da atividade é utilizado óleo de oliva (contendo mais de 75% de ácido oleico) como substrato. Assim, a utilização de uma mistura destes preparados parece ser uma alternativa interessante, uma vez que, segundo Valladão (2009), a gordura do efluente de abate de aves apresenta lipídeos com diferentes comprimentos de cadeia, variando de 6 a 24 átomos de carbono.

Vale ressaltar que, considerando as características do efluente em estudo, como uma mistura rica em gorduras e proteínas, a aplicação dos dois preparados tornou-se interessante em uma etapa de planejamento experimental, já que as lipases produzidas por diferentes micro-organismos possuem características distintas.

Pode-se concluir que o tempo de fermentação de 48 horas foi o que apresentou melhor relação custo/benefício em termos de atividade lipásica, sendo portanto adotado nas demais fermentações. Oito novas fermentações foram então realizadas com os fungos *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium brevicompactum*, nas condições ótimas de ensaio, sendo as tortas fermentadas caracterizadas quanto às suas atividades lipásica e proteásica, conforme

ilustrado na Tabela 4.1. Após retirada de alíquota para determinação das atividades, as tortas fermentadas foram embaladas à vácuo e estocadas a –20ºC, até o momento de sua utilização.

Tabela 4.1: Atividades lipásica e proteásica após 48 h de fermentação com os fungos *Penicillium simplicissimum* e *Penicillium brevicompactum,* média de oito fermentações.

micro-organismo	Atividade (U/g)	
	Lipásica	Proteásica
P. simplicissimum	8,7 ±1,4	25,9 ± 3,4
P. brevicompactum	48,6 ± 5,2	3,4 ± 0,5

Nota-se na Tabela 4.1 atividades lipásicas médias maiores que as encontradas nas duas primeiras fermentações, sobretudo para o fungo *P. brevicompactum*. Este fato pode estar relacionado à mudança do tempo de estocagem na preparação do inóculo e em uma melhor distribuição do ar umedecido na estufa onde foram realizadas as fermentações.

4.2 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFATANTE

4.2.1 **Micro-organismo, pré-inóculo, inóculo e meios de cultivo**

Foram realizadas três fermentações submersas utilizando *Pseudomonas aeruginosa* PA1, previamente selecionada de ambientes de petróleo como ótima produtora de biossurfatante (SANTA ANNA, 2000 *apud* KRONENBERGER *et al.,*2008). A cepa foi preservada em glicerol a 10% em ultrafreezer a -80ºC.

O pré-inóculo foi crescido em placa com YPDA (extrato de levedura 0,3%, peptona 1,5%, dextrose 0,1%, agar 1,2%) a 30ºC por 48 horas e transferido para frascos de 1000 ml com 300 ml de meio com a seguinte composição (g/L): $NaNO_3$ 1,0; KH_2PO_4 3,0; K_2HPO_4 7,0; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2; extrato de levedura 5,0; peptona 5,0 e glicerol P.A. 30,0. Após 24 horas de cultivo, o meio de fermentação contendo as células foi estocado em criotubos na relação glicerol/meio fermentado de 1:3 para servircomo pré-inóculo padrão em todas as fermentações.

O conteúdo de 1,0 ml do criotubo foi inoculado em 300 ml de meio de fermentação com a seguinte composição (g/L): glicerol 30,0; $NaNO_3$ 1,0; K_2HPO_4 7,0; KH_2PO_4 3,0; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2; extrato de levedura 5,0 e peptona 5,0. Os frascos foram então incubados

em agitadores rotatórios a 30ºC e 170 rpm por 40 horas. Ao final desse período, as células de cada frasco foram recuperadas por centrifugação (5000g por 20 minutos) e utilizadas como inóculo.

4.2.2 **Produção de ramnolipídeo por fermentação submersa**

Empregando-se a técnica de frascos agitados, utilizou-se erlermeyers de 500 mL (exceto para 1ª fermentação, na qual se utilizou os de 250 mL), com volume útil de 300 mL (150 mL para a 1ª fermenteção), agitados a 170 rpm em agitador rotatório (C25KC Incubator Shaker, New Brunswick Scientific), à temperatura de 30ºC.

O meio de cultura utilizado nas fermentações apresentava a seguinte composição em gramas por litro: glicerol 30,0; $NaNO_3$ 1,4; K_2HPO_4 7,0; KH_2PO_4 3,0 e $MgSO_4$.7H2O 0,2, resultando em uma relação carbono/nitrogênio igual a 60 (FERNANDES, 2010; KRONENBERGER *et al*.,2008; SANTOS *et al.,* 2002).

Após a fermentação, o caldo fermentado era autoclavado a 121 °C por 15 minutos, sendo em seguida centrifugado a 5000 g, a 15°C, por 20 minutos, obtendo-se assim o caldo bruto livre de células.

O conteúdo total do caldo bruto foi transferido para frascos de vidro estéril de 50 ml (sendo utilizado apenas 90% do volume total), que eram mantidos a -20º C até o momento de sua utilização.

4.2.3 **Resultados e discussão**

Alíquotas do caldo fermentado bruto livre de células foram retiradas e caracterizadas em termos de concentração de ramnolipídeo, índice de emulsificação, tensão superficial, concentração micelar crítica (CMC) e demanda química de oxigênio (DQO). Os resultados da caracterização estão dispostos na Tabela 4.2, sendo o biossurfatante obtido na primeira fermentação (F1) foi destinado aos testes de inibição e biodegradabilidade anaeróbia, já o obtido nas demais fermentações foram utilizados no pré-tratamento do efluente de abate de aves, etapa que antecedia o tratamento biológico anaeróbio.

Tabela 4.2: Caracterização físico-química do biossurfatante bruto produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1(caldo livre de células) utilizado no trabalho, nas três fermentações (F1, F2 e F3)

	F1	F2	F3
Concentração de Ramnolipídeo (g/L)	4,7	6,3	10,2
Tensão Superficial (mN/m)	28,0	29,2	29
Concentração Micelar Crítica (mg/L)	118,0	48,1	53,3
Índice de Emulsificação (%)	61	65	63
Demanda Química de Oxigênio (mg/L)	20767	25130	26609

Araujo *et al.* (2011) caracterizaram um biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* e obtiveram 7,5 g/L de ramnolipídeo, 29,8 mN/m de tensão superficial e CMC igual a 67 mg/L, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, à exceção da CMC da primeira fermentação. Zang *et al.* (2009 a) estudaram a produção e aplicação de biossurfatante tipo ramnolipídeo, produzido por *Pseudomonas sp*. no tratamento de efluente semi-sintético contendo elevada concentração de óleo de fritura. O biossurfatante apresentou 35 g/L de ramnolipídeo, 28,8 mg/L de concentração micelar crítica e tensão superficial igual a 30,1 mN/m.

A concentração micelar crítica é um parâmetro importante que indica a concentração mínima necessária de biossurfatante em solução para que ocorra a redução das tensões superficial e interfacial; ou seja, quanto menor a CMC, mais eficiente é o biossurfatante (MEIRA, 2007). A concentração micelar crítica (CMC) das três fermentações foi determinada pela medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas do caldo fermentado livre de células, como pode ser visualizado na Figura 4.3.

A concentração micelar crítica da primeira fermentação foi de 118 mg ramnolipídeo/L, diferente dos valores obtidos na segunda (48 mg ramnolipídeo/L) e terceira (53 mg ramnolipídeo/L) fermentações. Tal fato pode ter ocorrido devido à utilização de diferentes cepas estoque, da primeira para as demais fermentações, uma vez que, o meio e os demais parâmetros foram mantidos.

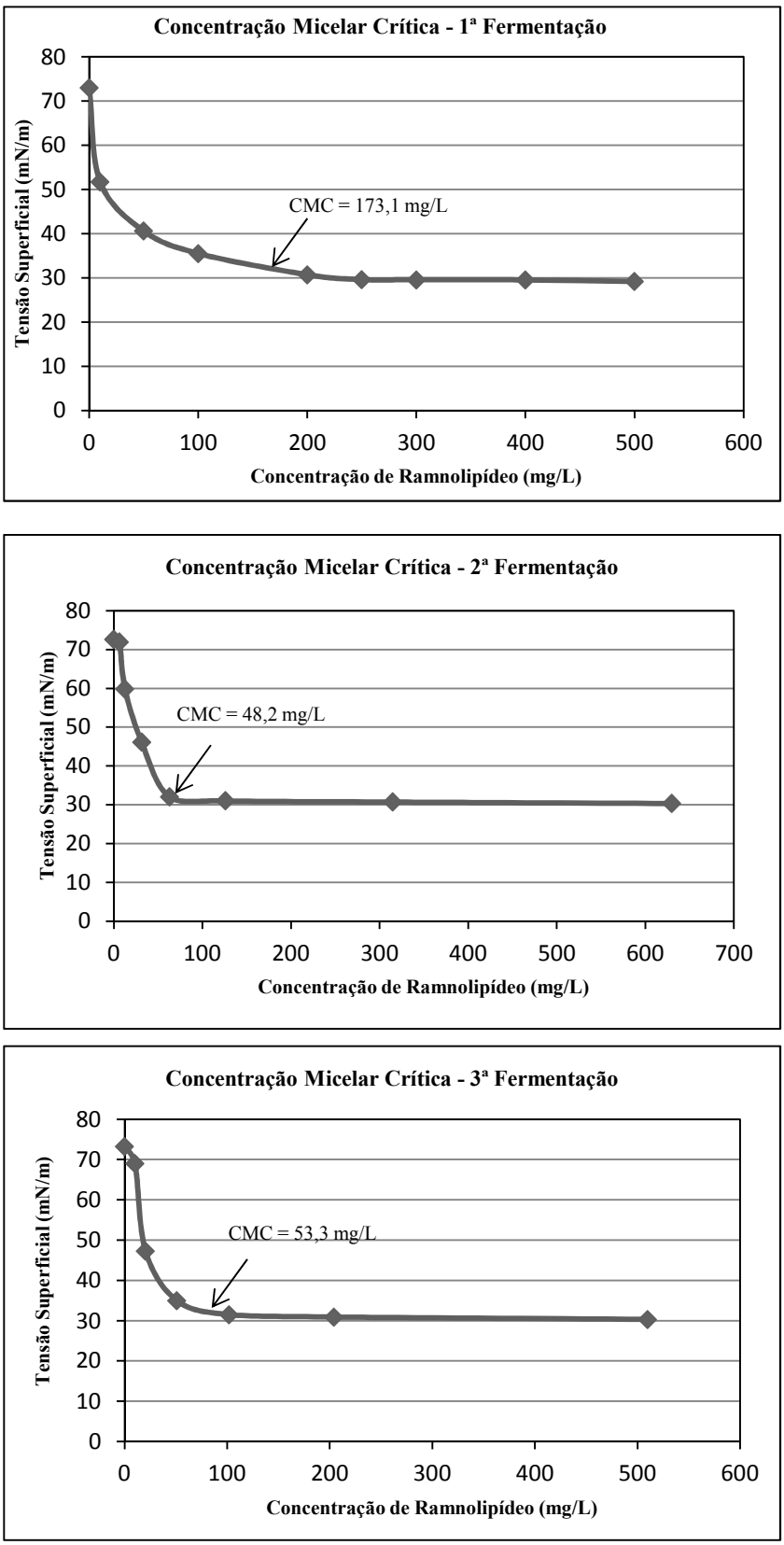


Figura 4.3: Determinação da Concentração Micelar Crítica, em função da tensão superficial, utilizando diluições sucessivas do caldo bruto da primeira, segunda e terceira fermentação utilizando *Pseudomonas aeruginosa* PA1.

4.3 INFLUÊNCIA DO BIOSSURFATANTE NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A hidrólise de óleos e gorduras é uma etapa importante no pré-tratamento de efluentes contendo alto teor de lipídeos. As lipases são enzimas hidrolíticas com elevado potencial biotecnológico devido principalmente aos consideráveis níveis de atividade e estabilidade que apresentam em meios aquosos e não aquosos, o que possibilita a catálise de diversas reações como acidólise, aminólise, alcoólise, esterificação e transesterificação (MESSIAS *et al.*, 2011).

Tendo como objetivo a utilização conjunta de *pools* enzimáticos e biossurfatante no pré-tratamento de efluentes de abate de aves, a avaliação da atividade lipásica na presença do biossurfatante tornou-se necessária.

As lipases são enzimas versáteis, porém devem se manter ativas na presença do biossurfatante. As lipases são ativadas na interface água-lipídeo e apresentam baixa atividade quando o substrato está na forma monomérica. Porém, sua atividade tende a aumentar dramaticamente acima do limite de solubilidade do substrato, momento que começam a se formar as emulsões (FERRATO *et al.*, 1997 *apud* SALAMEH e WIEGEL, 2010). Esta resposta é conhecida como ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998).

4.3.1 **Determinação da atividade lipásica**

As atividades lipásicas foram realizadas de acordo com procedimento descrito no item 3.2.1, utilizando emulsão composta por 5% (m/v) de óleo de oliva e 5% (m/v) de goma arábica em tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,0). Nesta emulsão foi então adicionado o preparado enzimático líquido (PEL), resultante da extração da enzima em estado sólido, em quatro situações distintas: somente o PEL (branco), PEL acrescido de biossurfatante (BS) em nível abaixo da concentração micelar crítica (CMC – 24 mg/L), PEL com BS na CMC (118 mg/L) e PEL acrescido de BS acima da CMC (590 mg/L).

O material foi incubado por 20 minutos a 35ºC e 200 rpm. A reação enzimática foi paralisada pela adição de acetona:etanol (1:1) e então titulada com NaOH 0,04 mol/L até pH 11,0.

4.3.2 **Resultados e discussão**

Foram analisadas três concentrações de ramnolipídeo obtido na primeira fermentação na dosagem da atividade lipásica dos *pools* produzidos pelos micro-organismos *P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*, tendo a concentração micelar crítica (CMC) como parâmetro. As atividades lipásicas apresentadas com a adição do biossurfatante estão apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Atividade lipásica dos *pools* enzimáticos produzidos pelos fungos *P. simplicissimum* e *P. brevicompactum* na presença de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, sendo "BS" – biossurfatante e "CMC" – concentração micelar crítica.

Concentração de BS (mg/L)		Atividade (U/g)	
		P. simplicissimum	*P. brevicompactum*
0	(sem BS)	9,6 ± 1,1	32,4 ± 2,8
24	(abaixo da CMC)	8,1 ± 2,1	32,8 ± 2,3
118	(na CMC)	8,6 ± 1,7	32,8 ± 1,3
590	(acima da CMC)	2,9 ± 1,6	8,3 ± 0,1

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a adição do biossurfatante em concentração igual ou abaixo da CMC não interferiu na atividade lipásica dos *pools* enzimáticos estudados. Já a adição do biossurfatante em concentração acima da CMC acarretou uma perda média de atividade de 70% para o *pool* produzido por *P. simplicissimum* e de 74% para o *pool* produzido por *P. brevicompactum*, indicando um efeito inibitório na atividade enzimática quando o biossurfatante é utilizadoem concentrações acima da CMC.

Salameh e Wiegel (2010) estudaram a influência de surfatantes na atividade lipásica de duas enzimas (LipA e LipB) produzidas pela bactéria termofílica *Thermosyntropha lipolytica* DSM 11003. Foram utilizados surfatantes aniônicos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) e colato de sódio; surfactantes catiônicos como o CTAB (brometo de hexadeciltrimetil amônio) e os surfactantes não iônicos Triton X-100, Tween 20 e Tween 80. Entre todos os detergentes testados, as duas lipases foram principalmente afetadas pelo SDS quando utilizadas concentrações inferiores à concentração micelar crítica (CMC). Na ausência de SDS, as atividades máximas de ambas LipA e LipB foram de 12,6 U/mg e 13,3 U/mg, respectivamente. Na presença de 0,2% de SDS, a atividade foi aumentada para 105 U/mg e 112 U/mg para LipA e LipB, respectivamente. Em concentrações mais elevadas de SDS (1% m/v), a atividade caiu para 4,5 U/mg e 10,6 U/mg para LipA e LipB, respectivamente. Este

resultado sugere que LipA foi inibida pela adição do surfactante, ao passo que LipB foi ligeiramente mais resistente à desativação por elevadas concentrações de SDS. Para o outro detergente iônico, colato de sódio, as lipases apresentaram apenas um modesto aumento de atividade. O CTAB (detergente catiônico) foi inibitório para ambas as lipases, mesmo em concentrações abaixo da CMC, o que pode ser atribuído a interações eletrostáticas favoráveis dos seus monômeros que causam desativação da enzima ou impedimento da sua ligação com o substrato (OTZEN, 2002).

De fato, alguns estudos, utilizando fluorescência e raios X, observaram que as micelas formadas após o alcance da CMC, ligam-se à tampa que cobre o sítio ativo e promovem mudanças na conformação da enzima (YAPOUDJIAN *et al*., 2002 *apud* SALAMEH e WIEGEL, 2010; CAJAL *et al*., 2000; BRITO e VAZ, 1986).

Divergências consideráveis no comportamento da atividade enzimática das lipases na presença de surfatantes catiônicos, aniônicos e não-iônicos são notadas (HELISTO e KORPELA, 1998). Os resultados obtidos neste trabalho também mostram divergências no comportamento da atividade lipásica, visto que não foi observado nenhum aumento de atividade na presença de biossurfatante em concentrações abaixo da CMC. Já em concentrações acima da CMC, os *pools* enzimáticos apresentaram comportamento similar ao encontrado por Salameh e Wiegel (2010) para o SDS.

4.4 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE E LODO

4.4.1 **Origem, coleta e caracterização do efluente**

O efluente utilizado neste trabalho foi proveniente de uma indústria de abate de aves localizada na cidade do Rio de Janeiro, sendo coletado depois do tanque de equalização e antes da etapa de flotação.

No total foram realizadas sete coletas, sendo medida a temperatura ainda no local e a retirada de amostras para as determinações analíticas como pH, DQO, sólidos suspensos (totais, fixos e voláteis), nitrogênio total , fósforo total e óleos e graxas, sendo o restante armazenado em freezer (-20°C).

4.4.2 **Origem, coleta e caracterização do lodo**

O lodo anaeróbio utilizado foi coletado no reator UASB em operação na mesma indústria de abate de aves em que o efluente foi coletado e foi caracterizado em termos de concentração de sólidos totais, fixos e voláteis (APHA, 2005). O lodo da coleta "A" foi utilizado para os testes de inibição/toxicidade e biodegradabilidade anaeróbia. O lodo da coleta "B" foi utilizado como inóculo para a partida dos biorreatores anaeróbios.

4.4.3 **Resultados e discussão**

Na Tabela 4.4 são apresentados os valores obtidos na caracterização do efluente coletado após a etapa de equalização. Como pode ser observado, existe uma ampla variabilidade dos parâmetros analisados, com exceção do pH e da temperatura, visto que se trata de um efluente industrial, e sua composição está sujeita a mudanças de procedimentos operacionais e a choques de carga. No entanto, os valores encontrados são compatíveis com a literatura, como pode ser visualizado na Tabela 2.1.

Tabela 4.4: Caracterização físico-química do efluente do abatedouro avícola

DATA DA COLETA (mês/ano)	pH	T (ºC)	DQO t.	DQO s.	O&G	SDT	SDF	SDV	SST	SSF	SSV	NT	PT
			(mg/L)										
11/2009	6,20	33	7800	5796	2771	2063	1302	761	6810	612	6198	413	5,3
01/2010	6,32	33	9574	7656	2034	1944	1363	581	2617	337	2280	432	7,0
03/2011	6,68	32	24300	20563	2111	1187	920	267	5653	153	5500	463	6,1
10/2011	5,80	30	15900	11525	2655	2144	1402	742	7534	729	6805	192	4,9
01/2012	5,60	33	82891	58137	14049	4268	2774	1494	12807	4482	8325	2213	9,5
05/2012	5,87	29	6534	4974	1306	3323	1983	1340	2520	30	2490	237	-
07/2012	6,35	30	28200	20175	2400	2227	2795	125	5874	3647	2227	503	-

A DQO total variou de 6534 mg/L a 82891 mg/L, com média igual a 25028 mg/L, caracterizando elevada concentração de matéria orgânica. A DQO solúvel variou de 4974 mg/L a 58147 mg/L, com média igual a 18404 mg/L, representando aproximadamente 74% da DQO total. A concentração de sólidos dissolvidos totais (SDT) foi de 2451±1017 mg/L e

de sólidos suspensos totais (SST) de 6259±3478 mg/L. Nota-se que o material sólido insolúvel (SST) é aproximadamente 2,5 vezes maior do que os sólidos solúveis (SDT), e representa 25% da DQO. De acordo com Masse, Kennedy e Chou (2001a), os sólidos não solúveis representam de 30 a 75% da carga poluidora dos efluentes de abatedouros de aves.

O material gorduroso, quantificado em termos de óleos e graxas (O&G), variou de 1306 mg/L a 14049 mg/L, com valor médio de 3904 mg/L, correspondendo a 15,6% da DQO total e aproximadamente 45% dos sólidos totais do efluente. De acordo com Sayed *et al*. (1988), os lipídeos são responsáveis por mais de 67% da demanda química de oxigênio particulada dos efluentes de abatedouros.

Oliveira *et al*. (2011) descrevem um efluente de abatedouro avícola contendo 1500 mg/L de sólidos totais, 1290 mg/L de sólidos voláteis, 86,8 mg/ L de nitrogênio amoniacal, 3,5 mg/L de fósforo total, 58 mg/L de potássio, 2490 mg/L de demanda química de oxigênio e pH 6,9. Já Debik e Coskun (2009) descrevem um efluente de abate de aves tendo 6880±1400 mg O_2/L de DQO, 675±110mg/L de nitrogênio total, 8,95±3,15 mg/L de fósforo total e pH médio de 6,85±1,25. Comparando estes efluentes com o utilizado neste trabalho, pode-se observar que os resultados encontrados são diferentes dos já publicados. Características como DQO, sólidos e O&G variam consideravelmente, pois efluentes industriais estão sujeitos aos procedimentos operacionais de cada indústria, inclusive em relação à minimização de resíduos e aos processos de tratamento de cada unidade.

A presença de óleos e graxas no efluente de abatedouros de aves torna, muitas vezes, a biodegradação do material lenta e, por vezes, ineficiente (RIGO *et al.,* 2008). Isto por que a hidrólise de lipídeos é a etapa limitante da digestão anaeróbia de sólidos presentes em diversos tipos de efluentes, devido ao baixo consumo de ácidos graxos de cadeia longa pelas bactérias (QUÉMÉNUER e MARTY, 1994 *apud* MENDES *et al*., 2005; KOMATSU, HANAKI e MATSUO,1991). Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), em concentrações milimolares, podem se tornar inibidores dos micro-organismos anaeróbios, pois impedem a absorção de substrato pelos micro-organismos, e adsorvidos à biomassa causam flotação da mesma e impedem a formação de grânulos de lodo em reatores anaeróbios de fluxo ascendente. A flotação do lodo também é decorrente da dificuldade de liberação de gases produzidos na digestão anaeróbia (HWU *et al.,* 1998; PETRUY e LETTINGA, 1997). Desta forma, surge a necessidade de um pré-tratamento para efluentes com alto teor de lipídeos, visando minimizar os efeitos deletérios dos AGCL sobre o consórcio microbiano anaeróbio.

A caracterização do lodo empregado nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia é apresentada na Tabela 4.5. Vale ressaltar que a quantidade de sólidos fixos é elevada, algo incomum para lodos anaeróbios. Isto é explicado pela utilização, na indústria, de coagulantes químicos para auxiliar a remoção de gordura na etapa de flotação. A concentração de sólidos apresentou uma queda acentuada entre as coletas A e B. Esta variação foi, provavelmente, reflexo de algum erro operacional no carregamento do biorreator UASB na indústria em questão como, por exemplo, a introdução de algum componente tóxico aos micro-organismos anaeróbios.

Tabela 4.5: Caracterização do lodo anaeróbio utilizado neste trabalho

Coleta	Sólidos Totais	Sólidos Totais Fixos	Sólidos Totais Voláteis
		(mg/L)	
A	31348 ± 5281	12413 ± 2827	18929 ± 3397
B	15090 ± 251	4278 ± 33	10798 ± 218

A atividade metanogênica específica (AME) deste lodo (0,173 g DQO_{CH4}/g SVS.d) foi determinada de acordo com procedimento descrito na seção 3.1.15 (CHERNICHARO, 2007) e mostrou-se compatível com valores citados na literatura: 0,17 – 0,23 g DQO_{CH4}/g SVS.d (BARBOSA, 1988) e 0,10 – 0,25 g DQO_{CH4}/g SVS.d (SCHELLINKHOUT *et. al.*, 1985), indicando que o lodo apresentava boa atividade metanogênica e poderia ser usado nos testes de biodegradabilidade anaeróbia e tratamento contínuo em biorreatores UASB de bancada.

4.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DOS *POOLS* ENZIMÁTICOS BIOSSURFATANTE

Como a etapa de pré-tratamento proposta antecede o tratamento secundário anaeróbio, a avaliação do comportamento da comunidade anaeróbia (lodo) na presença dos *pools* enzimáticos e do biossurfatante tornou-se necessária, uma vez que estes são solúveis, não podendo ser separados do efluente após pré-tratamento.

A primeira série de ensaios avaliou o efeito de concentrações crescentes do *pool* enzimático produzido pelo micro-organismo *P. simplicissimum* sobre a atividade do consórcio microbiano empregado como inóculo.

A segunda série de ensaios avaliou o efeito de concentrações crescentes do *pool* enzimático produzido pelo micro-organismo *P. brevicompactum* sobre a atividade do consórcio microbiano empregado como inóculo.

A terceira série de ensaios avaliou o efeito da adição de três concentrações diferentes de biossurfatante sobre o comportamento do lodo anaeróbio.

4.5.1 **Condução dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia**

Para analisar o possível efeito inibitório de compostos presentes nos *pools* enzimáticos e biossurfatante sobre o lodo anaeróbio, três séries de ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foram conduzidos com efluente bruto diluído (1:50), para evitar uma possível interferência do material gorduroso no processo de biodegradação, sendo suplementado com solução de macro-nutrientes (Tabela 4.6), para suprir a carência do efluente em relação à quantidade de fósforo total e adicioção de concentrações crescentes de: *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum*; *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* e biossurfatante produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* PA1.

Os ensaios ocorreram em regime de batelada, utilizando-se frascos tipo penicilina de 100 mL com 90 mL de volume útil. A quantidade de lodo utilizada em cada ensaio foi calculada para se manter uma relação DQO inicial:SVS do lodo de 1:1. O pH dos efluentes foi ajustado para 7,0±0,1 com adição de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M, antes da mistura com o lodo. Os frascos, após vedação com batoques de borracha e lacres de alumínio, foram incubados a 30ºC por até 10 dias.

O efeito inibitório foi avaliado através da medida de eficiência de remoção de DQO, produção de biogás (realizada por deslocamento do êmbolo de seringas plásticas graduadas de 20 mL conectadas aos frascos) e porcentagem de metano. Alíquotas para determinação da DQO inicial foram tomadas antes do contato com o lodo anaeróbio. A DQO solúvel final (obtida através da filtração do meio sobrenadante em membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,45 μm) foi determinada no último dia do ensaio, após coleta do biogás para análise em cromatógrafo gasoso (VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007).

Tabela 4.6: Solução de macronutrientes (CHERNICHARO, 2007)

Nutriente	Concentração (mg/L)
$NaHCO_3$	1000
KH_2PO_4	650
K_2HPO_4	150
NH_4Cl	500
$MgCl_2$	100
$CaCl_2.2H_2O$	100
$Na_2.7H_2O$	50
Extrato de levedura	50

4.5.2 **Resultados e discussão**

4.5.2.1 Efeito inibitório do *pool* enzimático produzido por *P. simplicissimum*

Os resultados obtidos na primeira série de ensaios, que avaliou o efeito de concentrações crescentes do *pool* enzimático produzido pelo micro-organismo *P. simplicissimum* sobre a atividade do consórcio microbiano empregado como inóculo, são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia com adição de diferentes percentuais do preparado enzimático sólido (PES) produzido pelo fungo *P. simplicissimum*

pool % (m/v)	DQO_T inicial (mg/L)	DQO_S final (mg/L)	DQO remov. (mg/L)	Remoção DQO (%)	Vol. Biogás (mL)	Vol. Metano (mL)	Metano (%)	Produção Específica de Metano (L CH_4/g DQO rem.)
0 (Controle)	166±2	35±3	131	78,9	2,7±0,6	1,6	60±1,79	0,136
0,10%	341±4	37±1	304	89,1	9,5±0,9	7,1	75±0,03	0,260
0,20%	576±1	40±1	536	93,1	16,8±2,0	12,3	73±0,13	0,255
0,50%	803±11	72±5	731	91,0	36,3±0,6	24,3	67±0,00	0,369
1,00%	1781±1	1137±4	644	36,2	19,8±1,0	11,3	57±0,47	0,195

A DQO inicial nos frascos variou de 166 a 1781 mg/L, uma variação de 90% entre os valores mínimo e máximo. Esta variação pode ser explicada pela adição de concentrações crescentes do *pool*, visto que a torta fermentada utilizada não contém apenas as enzimas de

interesse, mas também outros metabólitos produzidos pelo fungo e açúcares residuais da suplementação da fermentação em estado sólido com melaço.

A DQO solúvel ao final dos testes variou de 35 mg/L a 1137 mg/L, uma variação de 97%. Em relação à remoção de DQO, o efeito da adição do *pool* não é percebido nas concentrações de 0,1% a 0,5%, que variou de 89 a 93% contra 79% alcançado no Controle. Já a adição de 1,0% do *pool* resultou em uma redução de DQO de apenas 36%. Uma possível explicação para tal resultado pode estar relacionada à ação hidrolítica das enzimas sobre o lodo anaeróbio, uma vez que a quantidade de gordura presente no efluente diluído era baixa.

Segundo Cassini (2003), existem dois mecanismos de atuação dos agentes hidrolíticos na digestão anaeróbia: a hidrólise primária, que corresponde à desintegração e hidrólise de substratos complexos, geralmente de natureza orgânica, como complexos fibrosos de lignina e celulose, ceras, óleos, gorduras e lipídeos e a hidrólise secundária correspondente à morte ou decaimento da biomassa presente no lodo, o que pode ter acontecido em altas concentrações de *pool* enzimático.

Verifica-se que a produção de biogás é crescente até a adição de 0,5 % do *pool*, enquanto que com 1,0 % do *pool* sofre uma redução de 46%, comparando a produção com a obtida com adição de 0,5% de *pool*. Este efeito deletério pode estar relacionado à presença de compostos tóxicos presentes no *pool* enzimático obtido por fermentação no estado sólido do fungo *Penicillium simplicissimum*, de acordo com Valladão, Freire e Cammarota (2009).

Com relação à produção específica de metano (PEM), a qual mede a produção de metano em relação ao substrato consumido (SOARES e ZAIAT, 2005), observa-se uma produção crescente do metano nos experimentos com adição do *pool* enzimático até 0,5%. Ao se adicionar 1,0 % do *pool*, a produção específica de metano cai, indicando uma possível inibição da comunidade microbiana em altas concentrações de enzima.

Deste modo, pode-se concluir que no máximo 0,5% m/v de *pool* enzimático produzido por *P. simplicissimum* pode ser empregado a fim de se obter uma melhor atuação do consórcio microbiano em termos de remoção de DQO e produção de metano.

4.5.2.2 Efeito inibitório do *pool* enzimático produzido por *P.brevicompactum*

Os resultados obtidos na segunda série de ensaios, que avaliou o efeito de concentrações crescentes do *pool* enzimático produzido pelo micro-organismo *P. brevicompactum* sobre a atividade do consórcio microbiano empregado como inóculo, são apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8: Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia com adição de diferentes percentuais do *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum*

pool (% m/v)	DQO_T inicial (mg/L)	DQO_S final (mg/L)	DQO remov. (mg/L)	Remoção DQO (%)	Vol. Biogás (mL)	Vol. metano (mL)	Metano (%)	Produção Específica de m Metano (L CH_4/g DQO rem.)
0 (Controle)	166±2	35±3	131	78,9	2,7±0,6	1,6	60±1,79	0,136
0,10%	620±10	54±4	566	91,3	11,0±1,0	8,4	76±0,80	0,165
0,20%	670±0	56±1	614	91,6	23,0±1,3	17,0	74±0,10	0,308
0,50%	1330±14	691±8	639	48,0	10,0±1,3	7,7	77±0,10	0,134
1,00%	1737±35	1063±79	674	38,8	6,0±0,3	4,1	68±0,00	0,068

A DQO inicial nos frascos variou de 166 a 1737 mg/L, devido à adição de concentrações crescentes do *pool*, visto que a torta fermentada utilizada não contém apenas as enzimas de interesse, mas também outros metabólitos produzidos pelo fungo, como citado anteriormente.

Em relação à DQO solúvel final, a variação foi, em média, 96,7% comparando o valor mínimo (Controle) ao máximo (adição de 1,0 % de *pool*), variação similar à observada ao combinar *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* e lodo anaeróbio.

A remoção de DQO aumentou em comparação ao Controle, com a concentração do *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* até 0,2% m/v, chegando a 92% de remoção. No entanto, adições de 0,5% e 1,0% de *pool* resultaram em eficiências de remoção menores que no Controle, sendo 48% e 39%, respectivamente. Para o *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum*, as remoções de DQO foram maiores do que a apresentada pelo Controle até a adição de 0,5% m/v. Este fato pode ser explicado pela diferença de atividade lipásica. O *pool* produzido por *P. simplicissimum* apresentou menor atividade lipásica (8,7 U/g) quando comparado ao *pool* produzido por *P. brevicompactum* (48,6 U/g). Como consequência, em menores concentrações de *pool* produzido por *P.*

brevicompactum, já ocorre uma possível ação das enzimas hidrolíticas sobre o lodo anaeróbio, uma vez que foram mantidas as mesmas concentrações de gordura e matéria orgânica utilizadas nos teste com o *pool* produzido por *P. simplicissimum*.

A produção de biogás, bem como a produção específica de metano, aumentaram até a concentração de 0,2% m/v de adição do *pool*, decaindo com adições maiores que 0,5% m/v, indicando uma possível inibição ou hidrólise da comunidade anaeróbia frente a maiores concentrações de enzima, conforme citado.

Deste modo, pode-se concluir que no máximo 0,2% m/v de *pool* enzimático produzido por *P. brevicompactum* pode ser empregado a fim de se obter uma melhor atuação do consórcio microbiano em termos de remoção de DQO e produção de metano.

4.5.2.3 Efeito inibitório do biossurfatante

Na Tabela 4.9 são apresentados os resultados obtidos nos testes de biodegradabilidade anaeróbia em três condições: na CMC (118 mg/L), cinco vezes abaixo da CMC (24 mg/L) e cinco vezes acima da CMC (590 mg/L). A CMC foi adotada como parâmetro de referência por indicar a solubilidade do tensoativo na fase aquosa, ou seja, por ser a concentração mínima necessária para que ocorra a redução máxima da tensão superficial (água/ar) e interfacial (água/óleo) (PIRROLO, 2006).

Tabela 4.9: Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia com adição de diferentes concentrações do biossurfatante ([ ] BS) do tipo ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1

Condição [ ] BS (mg/L)	DQO_T inicial (mg/L)	DQO_S final (mg/L)	$DQO_{remov.}$ (mg/L)	Remoção DQO (%)	Vol.Biogás (mL)	Vol. metano (mL)	Metano (%)	Produção Específica de Metano (L CH_4/g DQO rem.)
0 (Controle)	166±2	35±3	131	78,9	2,7±0,6	1,6	60±1,79	0,136
24	374±21	64±3	340	82,9	12,1±0,4	8,5	70±2,70	0,278
118	1125±21	472±18	653	58,0	14,8±0,3	10,2	69±6,00	0,174
590	5307±8	3236±30	2071	39,0	6,1±0,1	1,8	30±13,0	0,010

A variação da DQO inicial deve-se ao fato de que foram adicionados diferentes volumes do caldo bruto fermentado livre de células contendo biossurfatante em cada condição. Em relação à remoção de DQO, pode-se observar uma queda com a adição crescente do biossurfatante, variando de 83% abaixo da CMC, a 58% na CMC e 39% acima da CMC,

contra 79% no Controle, o que pode ser reflexo de um possível efeito inibitório do biossurfatante sobre o consórcio microbiano anaeróbio.

Este efeito inibitório, provavelmente, está relacionado ao fato das micelas formadas quando o biossurfatante é adicionado em concentrações acima da CMC se ligarem ao sítio ativo das enzimas, levando a mudanças em sua conformação e até mesmo à sua desnaturação (SALAMEH e WIEGEL, 2010).

Com relação à produção de biogás, verifica-se que esta é crescente até a adição do biossurfatante na CMC, e decresce quando o biossurfatante é adicionado em concentração acima da CMC. Nesta última condição ocorre uma redução de 59% do volume de biogás, comparado ao obtido na condição que se situa na CMC, mais uma vez evidenciando o possível efeito inibitório apresentado pelo biossurfatante sobre o lodo. Outro fator que pode ter influenciado na diminuição do volume de biogás produzido foi a utilização do biossurfatante sem purificação (caldo bruto livre de células) o qual possuía outros metabólitos da fermentação que também podem ter contribuído para a inibição da atividade microbiana do lodo.

Pires (2005) estudou o efeito da adição de surfatantes no tratamento anaeróbio de efluente sintético com alto teor de gordura (similar ao efluente de suinocultura) e concluiu que a adição de surfatantes no tratamento anaeróbio pode resultar em alterações benéficas ou prejudiciais à comunidade microbiana anaeróbia. No estudo em questão, foi verificado que a adição do surfatante aniônico dodecilsulfato de sódio em concentrações acima de 150 mg/L inibiu a produção de metano, enquanto a adição de 15 mg/L do surfatante não iônico Tween 80 estimulou a produção do gás.

Com o término dos ensaios avaliando os possíveis efeitos deletérios ocasionados pelos bioprodutos em questão, uma nova série de experimentos foi iniciada, visando observar a solubilização e/ou hidrólise de matéria orgânica particulada com a adição de biossurfatante e/ou *pool* enzimáticos.

4.6 SOLUBILIZAÇÃO DO MATERIAL PARTICULADO NO EFLUENTE

4.6.1 **Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR)**

Nesta etapa do trabalho, os experimentos foram conduzidos conforme delineados por um Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR), o qual possibilita o planejamento e a execução das análises de forma organizada, com número reduzido de ensaios ao mínimo necessário (GOUVEIA *et al*., 2002). Este método permite ainda a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e a modelagem empírica dos resultados, em função das variáveis escolhidas, usando-se programas estatísticos de regressão.

Tal planejamento consistiu de um fatorial 2^n, com três repetições no ponto central e dois pontos sobre o eixo de cada variável n, a uma distância ± α do ponto central (pontos axiais). Os valores máximo e mínimo são representados por +1 e –1, respectivamente, e o ponto central por 0. Após a realização dos experimentos, os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa *Statistica 7.0* (RODRIGUES E LEMMA, 2009).

Foram realizados quatro planejamentos experimentais, descritos a seguir.

4.6.1.1 Primeiro planejamento: influência da concentração de biossurfatante e temperatura na solubilização da DQO

Em uma primeira etapa, observou-se a influência da concentração do biossurfatante e da temperatura na solubilização da DQO. Os experimentos foram conduzidos em becheres de 250 mL com 100 mL de meio constituído de efluente bruto (2034 mg O&G/L) e biossurfatante, com agitação (150 rpm) por até 6 horas, sendo retiradas alíquotas para análise em intervalos fixos de 1,5 h. Os valores das variáveis estudadas estão indicados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Valores reais e codificados das variáveis: concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) e temperatura (T).

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Concentração BS (mg/L)	66	83	124	164	181
Temperatura (ºC)	25	33	44	55	62,5

Para a análise estatística, utilizou-se o valor máximo da DQO solúvel (DQOs) como variável resposta. A DQOs foi quantificada em amostras submetidas a uma filtração em membranas de acetato de celulose com 0,45 µm de tamanho de poro.

4.6.1.2 Segundo planejamento: ação combinada de biossurfatante, *pool* enzimático e temperatura na solubilização da DQO

Ao término dos ensaios do primeiro planejamento, um novo planejamento foi realizado com a adição de mais uma variável: a concentração de *pool* enzimático produzido pelo micro-organismo *Penicillium simplicissimum*, a fim de se avaliar se a ação combinada de biossurfatante e *pool* enzimático ultrapassaria a ação da temperatura na solubilização da DQO, mantendo o mesmo modo operacional do experimento anterior, ou seja, duração de 6 horas, com retirada de amostras a cada intervalo de 1,5 horas. Os valores reais e codificados das variáveis estão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11: Valores reais e codificados das variáveis estudadas: concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS), temperatura (T) e *pool* enzimático produzido pelo *Penicillium simplicissimum* (E)

Variável	Níveis				
	-1,68	-1,00	0	1,00	1,68
BS (mg/L)	55	82	124	165	192
E (% m/v)	0,10	0,33	0,66	1,00	1,23
T (ºC)	25	32	42,5	53	60

4.6.1.3 Terceiro planejamento: ação combinada de biossurfatante e *pool* enzimático de *P. simplicissimum* na solubilização da DQO a 30ºC

Neste terceiro planejamento DCCR, os testes foram conduzidos fixando-se a temperatura em 30ºC, temperatura média do efluente e de operação do biorreator anaeróbio utilizado em etapa subsequente do tratamento, e variou-se as concentrações de biossurfatante

e do *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum.* Os valores reais e codificados estão expostos na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Valores reais e codificados das variáveis estudadas: concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (BS) e *pool* enzimático produzido pelo micro-organismo *Penicillium simplicissimum*

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Concentração BS (mg/L)	66	83	124	164	181
pool Enzimático (% m/v)	0,19	0,33	0,66	1,0	1,14

4.6.1.4 Quarto planejamento: ação combinada de biossurfatante e *pool* enzimático de *P. brevicompactum* na solubilização da DQO a 30ºC

Neste quarto planejamento DCCR, os testes foram conduzidos fixando-se a temperatura em 30ºC, temperatura média do efluente e de operação do biorreator anaeróbio utilizado em etapa subsequente do tratamento, e variou-se as concentrações de biossurfatante e do *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum.* Os valores reais e codificados são os já apresentados na Tabela 4.12.

4.6.2 **Resultados e discussão**

4.6.2.1 Influência da concentração de biossurfatante e temperatura na solubilização da DQO

Os valores de aumento da DQO solúvel (DQO solúvel nos tempos 1,5, 3, 4,5 e 6 h menos a DQO solúvel inicial) em cada teste do primeiro planejamento DCCR, tendo como variáveis a temperatura (T) e a concentração de biossurfatante, bem como a matriz codificada do planejamento, são apresentados na Tabela 4.13.

Observou-se melhores resultados nos ensaios A, B e G, nos quais os valores do aumento da DQO Solúvel foram 5598, 3627 e 4620 mg/L, respectivamente. Estes ensaios foram conduzidos no nível mais alto de temperatura (55ºC), indicando uma maior influência desta variável na solubilização de particulados, sobretudo material gorduroso.

Após o tratamento estatístico das respostas obtidas, foi possível verificar quais variáveis apresentaram efeito sobre o aumento da $DQO_{Solúvel}$, o que pode ser visualizado no gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.4.

Tabela 4.13: Matriz codificada e aumento da $DQO_{Solúvel}$ no decorrer dos ensaios tendo como variáveis a temperatura (T) e a concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS)

Ensaio	T	BS	Aumento da DQO solúvel				
			1,5h	3,0h	4,5h	6,0h	Máximo
A	1	1	1230	1790	2368	5598	5598
B	1	-1	892	1570	1820	3627	3627
C	-1	1	145	250	125	0	250
D	-1	-1	0	0	539	176	539
E	0	1,41	919	1111	1905	1739	1905
F	0	-1,41	0	403	827	1597	1597
G	1,41	0	493	1170	1930	4620	4620
H	-1,41	0	0	0	0	0	0
I	0	0	0	710	483	1703	1703
J	0	0	0	671	1300	1285	1300
K	0	0	119	350	511	589	589

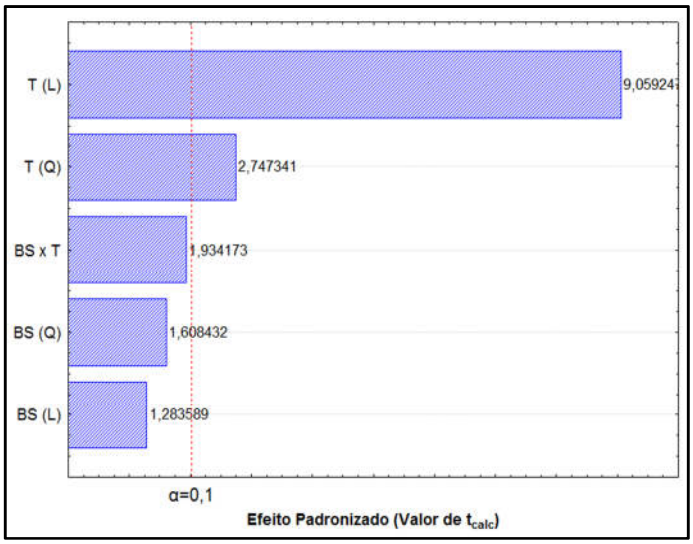


Figura 4.4: Efeitos padronizados para o aumento máximo da DQO solúvel, com a concentração de biossurfatante e temperatura como variáveis independentes.

Nota-se que somente a variável temperatura apresentou efeito positivo significativo sobre a variável resposta, tanto na forma linear quanto quadrática. No entanto, o efeito da interação entre biossurfatante e temperatura ficou próximo dos 90% de confiança e por este motivo esta interação também foi incluída na equação matemática abaixo, gerada pelo modelo:

$$\Delta\ DQO_S = 1567{,}4+1874{,}3.T+562{,}6.T^2+565{,}1.T.BS$$

onde “T” é a temperatura (ºC) e “BS” a concentração de biossurfatante.

A análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 4.14, foi empregada para se avaliar a adequação do modelo gerado.

Tabela 4.14: Análise de variância para o planejamento do delineamento composto central rotacional utilizando a concentração de biossurfatante e temperatura como variáveis independentes

Fonte de variação		Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F_{calc}
Regressão		31235246	3	10411749	23,12
Resíduos		3152935	7	450419	
	Falta de ajuste	2516289	5	503258	-
	Erro puro	636646	2	318323	-
Total		34388180	10	-	-

Coeficiente de determinação: r^2=0,908; $F_{0,1;3;7}$= 3,07.

Nota-se, pelos elevados valores do coeficiente de determinação (r^2 = 0,908) e de F calculado (23,12), 7,5 vezes maior que o valor crítico de F (F tabelado 3,07), que o modelo adotado está ajustado. Com base no modelo gerado para o aumento máximo da DQO solúvel foi construída a superfície de resposta em função da temperatura e da concentração de biossurfatante, apresentada na Figura 4.5.

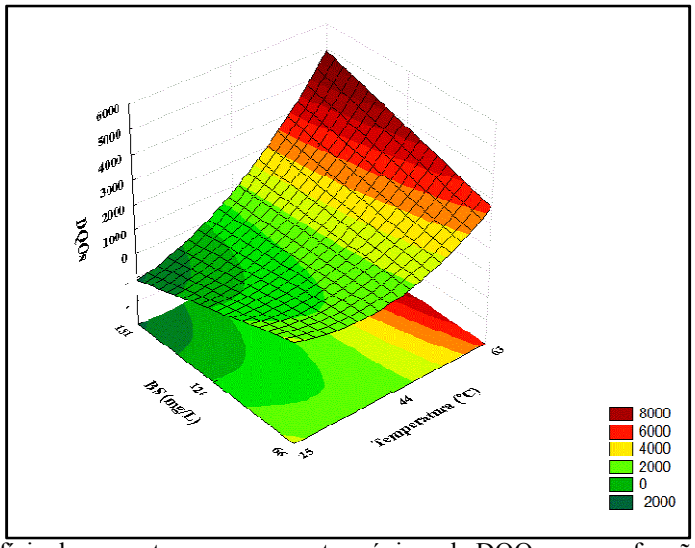


Figura 4.5: Superfície de resposta para o aumento máximo da $DQO_{Solúvel}$ em função da temperatura e concentração de biossurfatante.

A partir da análise da superfície de resposta é possível verificar que em maiores temperaturas (62,5ºC) e concentrações de biossurfatante acima da CMC encontram-se os maiores valores do aumento da $DQO_{Solúvel}$.

4.6.2.2 Ação combinada de biossurfatante, *pool* enzimático e temperatura na solubilização da DQO

As variações da DQO_S no decorrer dos testes (1,5, 3, 4,5 e 6h) do segundo planejamento DCCR, tendo como variáveis a temperatura (T), a concentração de biossurfatante e a concentração de *pool* enzimático, bem como a matriz codificada do planejamento, são apresentadas na Tabela 4.15.

Ao se combinar biossurfatante com *pool* enzimático, dois processos passam a ocorrer simultaneamente: a emulsificação das partículas de gordura e a ação das lipases presentes no *pool* enzimático, que hidrolisam as gorduras a ácidos graxos e glicerol, ambos aumentando a fração de $DQO_{Solúvel}$ no efluente. Observou-se que melhores resultados foram obtidos nos ensaios A, F, H e N, nos quais o aumento máximo da DQO_S foi 2140, 2208, 2000 e 2708 mg O_2/L, respectivamente.

Tabela 4.15: Matriz codificada e aumento da $DQO_{Solúvel}$ no decorrer dos ensaios tendo como variáveis a temperatura (T), a concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1(BS) e de *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum*(T)

Exp	BS (%)	E (%)	T (ºC)	Aumento da DQO solúvel 1,5 h	3 h	4,5 h	6 h	Máximo
A	1	1	1	1077	2083	2140	2023	2140
B	1	1	-1	0	0	0	0	0
C	1	-1	-1	0	0	0	0	0
D	-1	-1	-1	0	0	0	0	0
E	-1	-1	1	248	850	842	1332	1332
F	-1	1	1	498	1745	1688	2208	2208
G	-1	1	-1	0	0	0	0	0
H	1	-1	1	1100	1413	1617	2000	2000
I	-1,68	0	0	403	927	1275	1650	1650
J	1,68	0	0	350	480	1017	673	1017
K	0	-1,68	0	113	453	743	260	743
L	0	1,68	0	413	860	997	657	997
M	0	0	-1,68	5	60	293	0	293
N	0	0	1,68	722	1248	2135	2708	2708
O	0	0	0	302	585	745	210	745
P	0	0	0	200	497	647	133	647
Q	0	0	0	25	510	445	145	510

Ao término dos ensaios, o tratamento estatístico das respostas foi efetuado para verificar quais variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre o aumento da DQO solúvel, como pode ser visualizado no gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.6.

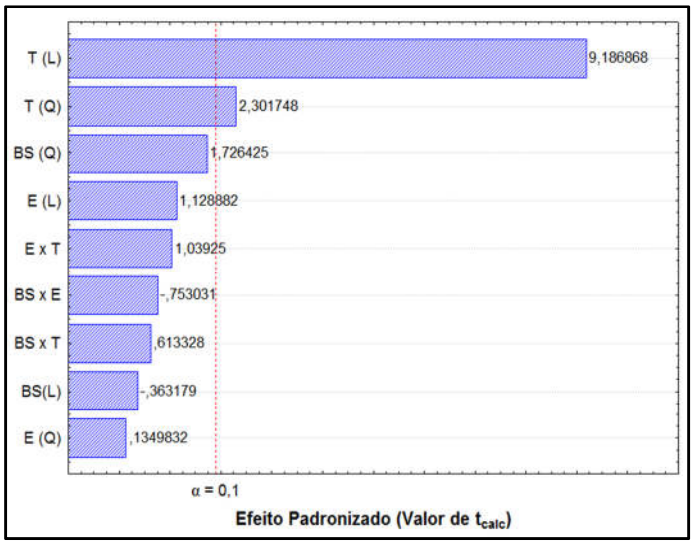


Figura 4.6: Efeitos padronizados para o aumento máximo da DQO solúvel, utilizando biossurfatante, *pool* enzimático e temperatura como variáveis independentes.

Nota-se que a variável temperatura apresentou efeito positivo significativo sobre a variável resposta, tanto na forma linear quanto quadrática. A variável biossurfatante na forma quadrática ficou próxima dos 90% de confiança e, portanto, foi incluída na equação matemática gerada pelo modelo. O fato da concentração de enzima não ter apresentado efeito significativo pode ser atribuído a uma ação mais lenta da enzima sobre a gordura, quando comparada ao biossurfatante e à temperatura. A equação do modelo é apresentada a seguir:

$$\Delta \text{ DQOS} = 672{,}5 + 174.BS^2 + 860{,}2.T + 233{,}3.T^2$$

Sendo: “BS” a concentração de biossurfatante e “T” a temperatura

Novamente, foi realizada a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 4.16, para verificar a adequação do modelo gerado.

Pode-se afirmar que, devido aos altos valores do coeficiente de determinação (r^2 = 0,897) e de F calculado (38,0), 14,8 vezes maior que o valor crítico de F (F tabelado, 2,56), o modelo adotado está ajustado. Com base no modelo gerado para o aumento máximo da DQO solúvel foi construída a superfície de resposta (Figura 4.7) em função da temperatura e da

concentração de biossurfatante, uma vez que a adição do *pool* enzimático não foi estatisticamente significativa.

Tabela 4.16: Análise de variância do planejamento do delineamento composto central rotacional utilizando biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, temperatura e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum*

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calc.
Regressão	10956255	3	3652085	38
Resíduos	1249828	13	96141	-
Falta de ajuste	1221970	11	111088	-
Erro puro	27857	2	13929	-
Total	122060083	16	-	-

Coeficiente de determinação: $r^2 = 0,897$; $F_{0,1;3;13} = 2,56$

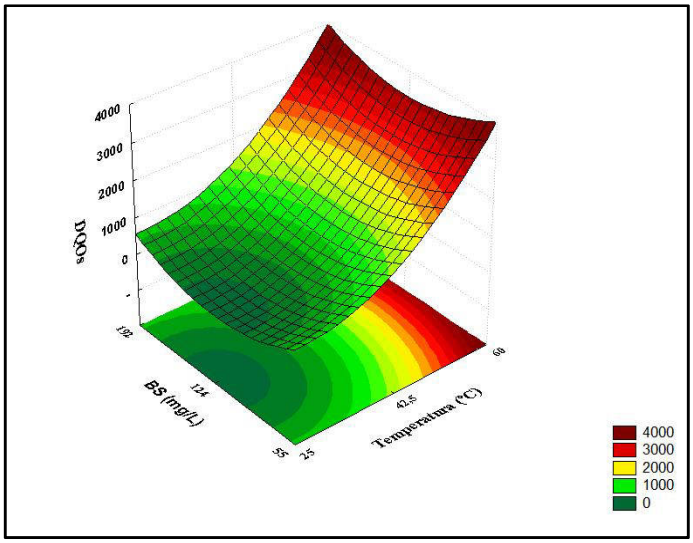


Figura 4.7: Superfície de resposta para o aumento máximo da $DQO_{Solúvel}$ em função da temperatura e concentração de biossurfatante sem a ação do *pool* enzimático.

Analisando a superfície de resposta foi possível verificar que em maiores temperaturas (60ºC) encontram-se os maiores valores de aumento da $DQO_{Solúvel}$. Novamente, a variável temperatura teve mais efeito na solubilização das partículas de gordura, sobrepujando qualquer outro efeito que poderia estar acontecendo no meio.

Portanto, foi realizado um novo teste a fim de se avaliar o efeito somente da temperatura sobre a solubilização da DQO, como pode ser visualizado na Figura 4.8. Para tanto, adicionou-se azida sódica ao meio para uma concentração de 0,1 g/L, a fim de inibir a ação dos micro-organismos endógenos presentes no efluente.

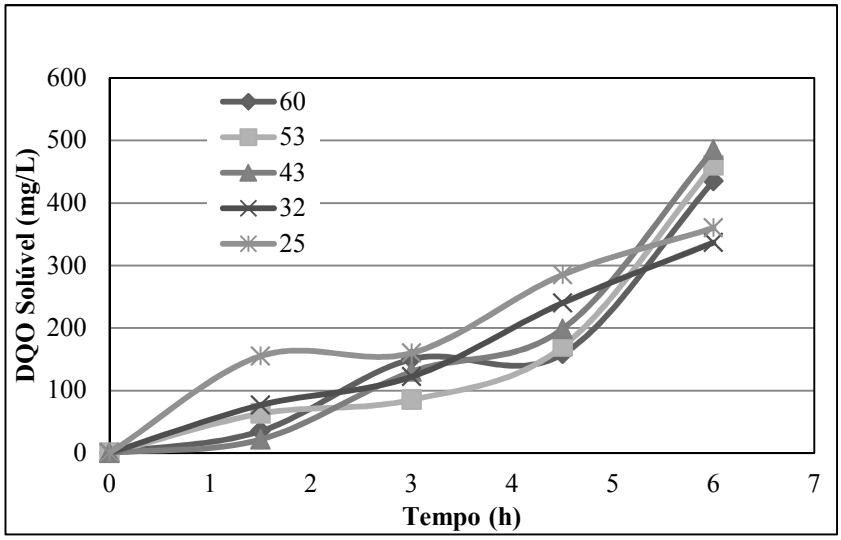


Figura 4.8: Aumento da DQO solúvel no decorrer do tempo, em diferentes temperaturas.

Como já evidenciado nos primeiros estudos, confirmou-se a ação da temperatura sobre a solubilização da DQO do efluente. Nota-se que o aumento da DQO solúvel é maior em maiores temperaturas (60, 53 e 43ºC), principalmente no último ponto analisado (6 horas).

No entanto, alguns trabalhos na literatura citam como melhor tempo de hidrólise (ação do *pool* enzimático sobre o efluente), um total de 4 horas (VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2009; LEAL *et al.,* 2006; ROSA, FREIRE e CAMMAROTA, 2006;). Neste tempo, pode-se verificar que as temperaturas de 25ºC e 32ºC apresentaram maior influência na solubilização da DQO. Aliado a isto, tem-se a temperatura média do efluente (31±2ºC) e a operação dos biorreatores anaeróbios empregados após a etapa de hidrólise/solubilização das gorduras na faixa mesofilica (30ºC). Portanto, decidiu-se fixar a temperatura de ensaio em 30ºC e diminuir o tempo de ensaio para 4,5 horas, ainda adicionando azida sódica para uma concentração de 0,1 g/L como inibidor da atividade bacteriana.

Mais dois estudos foram executados, observando-se a solubilização da DQO a 30ºC, temperatura média do efluente de abate de aves, bem como de operação do biorreator anaeróbio que será utilizado na etapa subsequente do tratamento. Nestes foram utilizados como coadjuvantes o biossurfatante e os *pools* enzimáticos produzidos pelos fungos *P. simplicissimum* e *P. brevicompactum.*

4.6.2.3 Ação combinada de biossurfatante e *pool* enzimático de *P. simplicissimum* na solubilização da DQO a 30ºC

As variações da $DQO_{Solúvel}$ no decorrer do teste do terceiro planejamento DCCR, utilizando *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* e o biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, bem como a matriz codificada do planejamento, estão apresentadas na Tabela 4.17.

Tabela 4.17: Matriz codificada e aumento da DQO solúvel no planejamento experimental utilizando *pool* enzimático produzido pelo *P. simplicissimum* (E_s) e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) como variáveis independentes, com temperatura fixa (30ºC)

Ensaio	Variáveis Codificadas		Aumento da DQO solúvel			
	BS	E_s	1,5h	3h	4,5h	Máximo
A	1	1	293	723	1170	1170
B	1	-1	247	360	407	407
C	-1	1	460	710	310	710
D	-1	-1	73	257	0	257
E	0	1,41	635	808	425	808
F	0	-1,41	78	253	0	253
G	1,41	0	233	540	277	540
H	-1,41	0	173	315	187	315
I	0	0	430	465	450	465
J	0	0	429	457	427	457
K	0	0	414	417	396	417

Os ensaios A, C e E foram os que apresentaram melhores resultados, ou seja, maior valor da DQO_S, 1170, 710 e 808 mg O_2/L, respectivamente. Ressalta-se que estes três ensaios são as que apresentavam maior concentração de enzima.

Novamente, ao término dos ensaios, o tratamento estatístico das respostas foi efetuado, sendo possível verificar que variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre o aumento da DQO solúvel, o que pode ser visualizado no gráfico de Pareto apresentado na Figura 4.9.

Contrariando o primeiro estudo, no qual a concentração de enzima não apresentou efeito significativo, neste a variável enzima (forma linear) passou a apresentar efeito positivo significativo sobre a variável resposta, ou seja, com a fixação da temperatura em 30°C e a adição da solução de azida sódica, esta variável passou a ter efeito sobre a solubilização da DQO. A variável biossurfatante continuou sendo estatisticamente significativa, porém o efeito sinérgico entre enzima e biossurfatante não foi estatisticamente positivo.

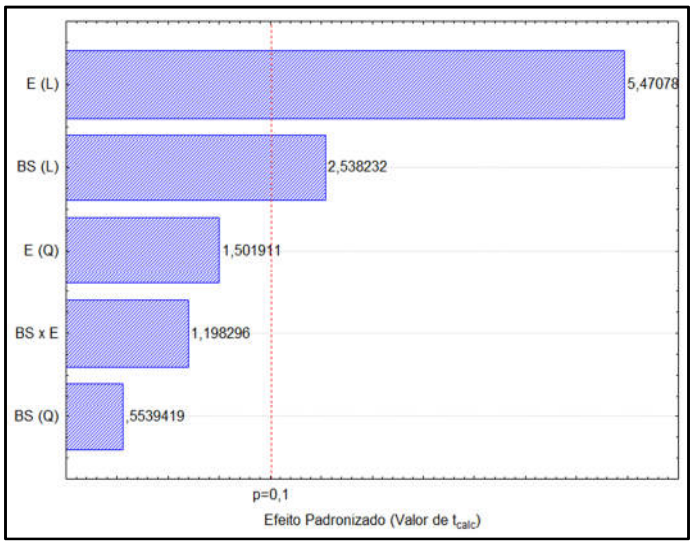


Figura 4.9: Efeitos padronizados para o aumento máximo da DQO solúvel, utilizando biossurfatante e *pool* enzimático (*P. simplicissimum*) a 30ºC.

Portanto, as variáveis: enzima e biossurfatante linear foram selecionadas para obtenção do modelo matemático a seguir:

$$\Delta \text{ DQOS} = 527 + 251 \text{ E}_s + 527 \text{ BS}$$

Sendo: "Es" a porcentagem de *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* e "BS" a concentração de biossurfatante.

Para verificação do ajuste, os resultados foram submetidos à análise de variância, como pode ser verificado na Tabela 4.18.

Tabela 4.18: Análise de variância para o planejamento do delineamento composto central rotacional utilizando biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* a 30ºC

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calc.
Regressão	608894	2	304447	17
Resíduos	145626	8	18203	-
Falta de ajuste	144307	6	24051	-
Erro Puro	1319	2	660	-
Total	754520	10	-	-

Coeficiente de determinação: $r^2 = 0,806$; $F_{0,1;2;8} = 3,11$

A análise de variância indicou uma porcentagem de variação explicada de 80,6%, um pouco menor quando comparada aos demais estudos, mas ainda considerada alta para bioprocessos. Sendo assim, devido ao alto coeficiente de determinação e valor de F calculado superior ao tabelado (mais que 5 vezes), sugere-se que o modelo é adequado para avaliar o comportamento da DQO solúvel frente a adição de biossurfatante e *pool* enzimático, sendo então gerada a superfície de resposta apresentada na Figura 4.10.

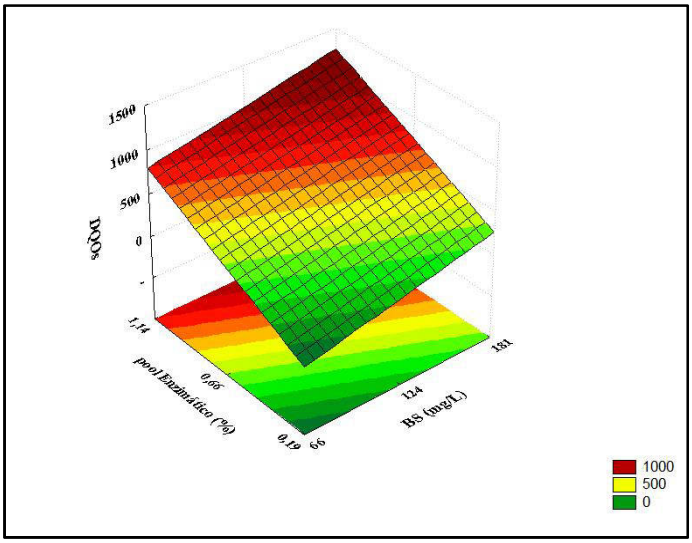


Figura 4.10: Superfície de resposta resultante do planejamento experimental tendo como variáveis a concentração de biossurfatante e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* a 30ºC.

Analisando a superfície de resposta, pode-se afirmar que as maiores solubilizações da DQO ocorrem na adição de concentrações média a alta de biossurfatante e altas porcentagens de *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum.*

Como o *pool* enzimático produzido por *P. simplicissimum* difere do *pool* produzido por *P. brevicompactum*, outra série de ensaios foi realizada, mantendo-se todos os parâmetros utilizados e mudando apenas o *pool* para o produzido por *P. brevicompactum*.

4.6.2.4 Ação combinada de biossurfatante e *pool* enzimático de *P. brevicompactum* na solubilização da DQO a 30ºC

As variações da DQO solúvel no decorrer dos testes do quarto planejamento DCCR, bem como a matriz codificada do planejamento, utilizando como variáveis o *pool* produzido

por *P. brevicompactum* e o biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, estão apresentadas na Tabela 4.19.

Tabela 4.19: Matriz codificada e aumento da DQO solúvel no planejamento experimental utilizando *pool* enzimático produzido pelo *P. brevicompactum* (E_b) e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1(BS), com temperatura fixa (30ºC)

Ensaios	Variáveis Codificadas		Aumento da DQO solúvel			
	BS	E_b	1,5h	3,0h	4,5h	Máximo
A	1	1	498	513	862	862
B	1	-1	202	455	532	532
C	-1	1	225	411	745	745
D	-1	-1	283	370	380	380
E	0	1,41	358	618	1038	1038
F	0	-1,41	341	415	325	415
G	1,41	0	181	398	561	561
H	-1,41	0	408	491	643	643
I	0	0	398	508	768	768
J	0	0	401	509	794	794
K	0	0	402	572	757	757

Nota-se que os ensaios que tiveram maior aumento da DQO solúvel foram os nomeados A e E, obtendo um aumento de 862 e 1038 mg/L, respectivamente, sendo ensaios em que o *pool* enzimático foi adicionado em porcentagens mais altas e o biossurfatante nas concentrações média a alta. Os ensaios referentes ao ponto central I, J e K, bem como o ensaio C, também apresentaram aumento significativo da DQO solúvel. Após o levantamento da solubilização da DQO, os resultados foram submetidos ao tratamento estatístico e o gráfico de Pareto gerado é apresentado na Figura 4.11.

Analogamente ao resultado obtido no estudo em que se utilizou *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* e biossurfatante, a variável enzima produzida pelo fungo *P. brevicompactum* (Eb) foi o parâmetro que apresentou maior influência na solubilização da DQO, seguida do biossurfatante. Novamente, a interação entre estes parâmetros não foi estatisticamente evidenciada. Para obtenção do modelo matemático foram utilizadas as variáveis biossurfatante e enzima, como mostrado abaixo:

$$\Delta \text{ DQOS} = 745 + 199\ E_b - 86\ BS^2$$

Sendo: "E_b" a porcentagem de *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* e "BS" a concentração de biossurfatante.

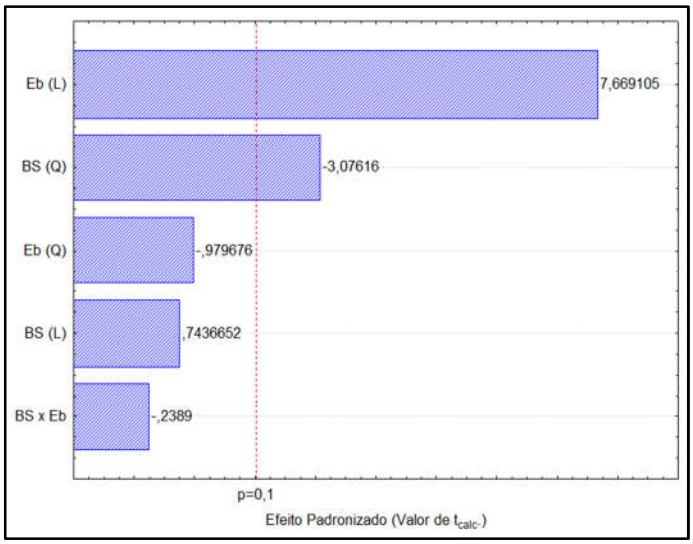


Figura 4.11: Efeitos padronizados para o aumento máximo da DQO solúvel, utilizando biossurfatante e *pool* enzimático (*P. brevicompactum*) a 30ºC.

Para validação do modelo gerado foi realizada a análise de variância, como pode ser visualizada na Tabela 4.20. Pode-se afirmar que o modelo está ajustado devido ao alto coeficiente de determinação (91,1%) e pela diferença entre o valor de F calculado (41) e o valor de F tabelado (3,11). Portanto, pode-se obter a superfície de resposta, visualizada na Figura 4.12.

Tabela 4.20: Análise de variância para o planejamento do delineamento composto central rotacional utilizando biossurfatante e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* a 30ºC

Fonte de variação	**Soma dos quadrados**	**Graus de liberdade**	**Quadrado médio**	**F calc.**
Regressão	361265	2	180632	41
Resíduos	35253	8	4407	-
Falta de ajuste	34531	6	5755	-
Erro Puro	722	2	361	-
Total	396518	10	-	-

Coeficiente de determinação: $r^2 = 0,911$; $F_{0,1;2;8} = 3,11$

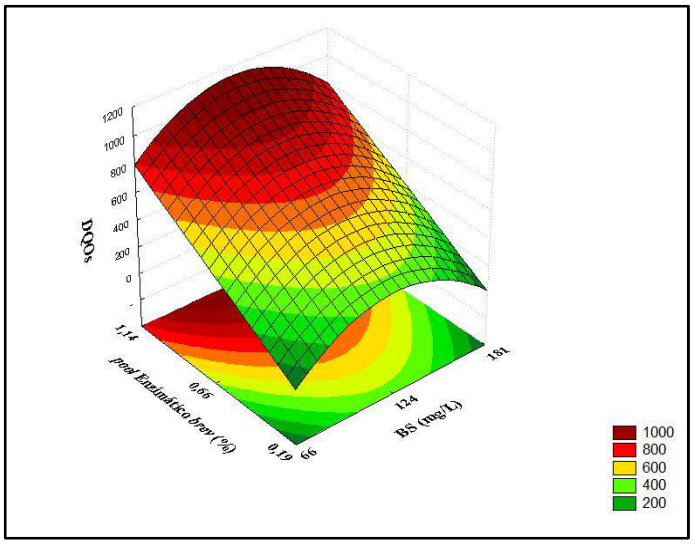


Figura 4.12: Superfície de resposta resultante do planejamento experimental tendo como variáveis a concentração de biossurfatante e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum*.

Pela superfície de resposta pode-se concluir que a solubilização da DQO foi maior quando se utilizou porcentagens de *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* nos níveis médio a alto e concentrações medianas de biossurfatante.

De posse de todos estes resultados, chegou-se à conclusão de que a utilização de biossurfatante e *pools* enzimáticos em concentrações mais altas resultavam em maiores aumentos de DQO solúvel. No entanto, nos testes de inibição anaeróbia, foi constatado que adições acima de 0,5% e 0,2% (m/v) de *pool* enzimático produzido pelos fungos *P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*, respectivamente, e biossurfatante em concentrações acima da CMC, exerciam efeito deletério sobre os micro-organismos anaeróbios.

Assim, para atingir os objetivos propostos, seria necessária uma integração entre o processo, a estatística e o bom senso, e por este motivo iniciou-se outra série de experimentos, visando uma interação entre as variáveis que resultasse em melhor custo-benefício, visando aumento da produção de biogás pelos processos anaeróbios.

4.7 ENSAIOS PRELIMINARES DE BIODEGRADABILIDADE ANAERÓBIA

4.7.1 **Procedimento experimental**

O pré-tratamento de solubilização/hidrólise da DQO particulada foi realizado a 30°C e 150 rpm, durante quatro horas, em cinco condições: com concentração de biossurfatante acima da CMC (181 mg/L); com concentração de *pool* enzimático no nível mais alto estudado nos testes de solubilização da DQO (1,14% m/v); e com três combinações *pool* enzimático e biossurfatante classificadas como mínima (0,19% de *pool* acrescido de biossurfatante abaixo da CMC - 66 mg/L), média (0,66% de *pool* acrescido de biossurfatante na CMC - 118 mg/L) e máxima (1,14% de *pool* e biossurfatante acima da CMC - 181 mg/L).

Após adição do biossurfatante e/ou *pools* enzimáticos ao efluente, a mistura era colocada em contato com o lodo anaeróbio, mantendo-se uma relação 1:1 (SSV lodo: DQO efluente), em frascos tipo penicilina de 100 mL, utilizando 90% do volume total. Os frascos eram lacrados com batoque de borracha e selo de alumínio e dispostos em sala climatizada com temperatura controlada a 30 °C. Aos frascos eram conectadas seringas plásticas graduadas de 60 mL, onde o biogás era coletado e medido diariamente. Ao cessar a produção de biogás, os frascos eram abertos e o sobrenadante separado para análise da DQO solúvel residual e o biogás levado ao cromatógrafo gasoso para quantificação do metano.

4.7.2 **Resultados e discussão**

Para avaliar o efeito da combinação biossurfatante e *pool* enzimático que resultasse em melhores produções específicas de metano (PEM), dois testes de biodegradabilidade anaeróbia foram realizados (um com o *pool* produzido por *P. simplicissimum* e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e um outro com o *pool* produzido por *P. brevicompactum* e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1) com efluente de abate de aves bruto, com DQO média de 4130±98 mg/L e 1165 mg O&G/L (Controle) e com o mesmo efluente após tratamento com enzima/biossurfatante.

4.7.2.1 Testes de biodegradabilidade anaeróbia após pré-tratamento com o *pool* de *P. simplicissimum* e biossurfatante

A Tabela 4.21 apresenta os resultados obtidos nos testes de biodegradabilidade anaeróbia do efluente de acordo com o procedimento citado no item 4.7.1, sendo o *pool*

utilizado produzido pelo micro-organismo *P. simplicissimum* e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1.

Tabela 4.21: Resultado do teste de biodegradabilidade anaeróbia com adição do biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. simplicissimum* (Es)

Condição	DQO_T inicial (mg/L)	DQO_S final (mg/L)	DQO removida (mg/L)	Volume biogás (mL)	Volume metano (mL)	Produção Específica de Metano (L CH_4/g DQO remov.)
0,19% Es +66 mg/L BS	4740±42	138±16	4602	95	69	0,167
0,66 % Es + 124 mg/L BS	9166±85	141±17	9025	159	120	0,148
1,14 % Es + 181 mg/L BS	9715±115	236±18	9479	144	108	0,127
1,14% Es	8343±231	190±9	8153	116	86	0,117
181 mg/L BS	5843±250	200±3	5643	84	62	0,122
Controle	3921±139	185±1	3736	40	32	0,095

A DQO inicial variou de 3921 a 9715 mg/L devido às diferentes concentrações de *pool* e biossurfatante adicionadas em cada condição, conforme mencionado anteriormente em 4.5. Enzima e biossurfatante não afetaram a remoção de DQO, que variou de 95% (quando se utilizou apenas o efluente) a 98% (para 124 mg/L de biossurfatante e 0,66% m/v de enzima). No entanto, o volume e a produção específica de metano foram substancialmente menores (de 1,2 a 3,8 vezes) quando foi utilizado somente o efluente. A condição em que o pré-tratamento do efluente foi realizado com a adição conjunta de 0,19% m/v do *pool* e 66 mg/L do biossurfatante foi a que apresentou maior produção específica de metano, ressaltando-se que nesta condição o lodo recebeu carga inicial de DQO próxima ao ensaio conduzido somente com efluente.

Comparando-se os valores de produção específica de metano na Tabela 4.21, verifica-se que a adição conjunta de enzima e biossurfatante, à exceção do ensaio em que ambos foram adicionados nos valores máximos estudados, levaram a maiores produções específicas de metano que nos ensaios em que estes produtos foram adicionados de forma isolada. Estes resultados indicam a ocorrência de um efeito sinérgico de disponibilização/hidrólise observado na atuação conjunta do biossurfatante e do *pool* enzimático que levou a bons resultados de remoção de DQO e produção de metano.

4.7.2.2 Testes de biodegradabilidade anaeróbia após pré-tratamento com o *pool* de *P. brevicompactum* e biossurfatante

Na Tabela 4.22 são apresentados os resultados obtidos nos testes de biodegradabilidade anaeróbia do efluente de acordo com o procedimento explicado anteriormente, sendo utilizado o *pool* produzido pelo micro-organismo *P. brevicompactum* (E_b) e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1.

Verifica-se que a DQO inicial variou de 3343 a 9149 mg/L, devido aos fatores já citados, como concentração de biossurfatante e *pool* enzimático. Os valores de DQO inicial foram menores que os encontrados no teste anterior, em que se utilizou o *pool* produzido por *P. simplicissimum*, provavelmente devido a dois fatores: suplementação da torta de babaçu com fonte adicional de carbono na fermentação com *P. simplicissimum*, procedimento que não era realizado para obtenção do *pool* produzido pelo fungo *P. brevicompactum*; e consumo da matéria orgânica presente no efluente por micro-organismos endógenos de natureza psicrofílica durante o processo de congelamento do efluente, pois além do decréscimo da DQO houve um escurecimento do efluente entre os dois ensaios. Este fato também foi observado por Valladão (2009) ao analisar a biodegradabilidade anaeróbia de efluente de abate de aves após hidrolise enzimática utilizando lipases fúngicas produzidas pelo micro-organismo *Penicillium restrictum*. A autora notou aumento na turbidez e escurecimento do efluente ao longo do tempo, sugerindo um aumento do crescimento microbiano à custa do consumo de DQO.

Tabela 4.22: Resultado do teste de biodegradabilidade anaeróbia com adição do biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) e *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* (E_b)

Condição	DQO_T inicial (mg/L)	DQO_S final (mg/L)	DQO removida (mg/L)	Volume biogás (mL)	Volume metano (mL)	Produção Específica de Metano (L CH_4/g DQO remov.)
0,19% E_b +66 mg/L BS	4140±18	113±10	4027	75	59	0,163
0,66 % E_b + 124 mg/L BS	6845±30	126±16	6719	79	61	0,101
1,14 % E_b + 181 mg/L BS	9149±70	232±21	8917	50	39	0,048
1,14% E_b	8090±93	204±19	7886	53	40	0,057
181 mg/L BS	5450±141	195±4	5255	74	57	0,121
Controle	3343±138	212±3	3131	35	28	0,098

A remoção de DQO variou de 94% no Controle a 98% quando se utilizou efluente pré-tratado com 124 mg/L de biossurfatante e 0,66% m/v de *pool* enzimático produzido por *P. brevicompactum*. Ou seja, enzima e biossurfatante não interferiram na remoção de matéria orgânica.

Em relação à produção específica de metano pode-se observar uma queda de 40% ao se comparar o efluente bruto ao pré-tratado com 0,19% m/v do *pool* e 66 mg/L do biossurfatante, indicativo de uma sinergia entre estes bioprodutos nestas concentrações, resultando em melhores produções de metano.

Ao término destes dois testes de biodegradabilidade anaeróbia concluiu-se que as melhores combinações para o pré-tratamento de efluentes com alto teor de gordura, como o de abate de aves, foram aquelas em que se utilizou biossurfatante em concentrações abaixo da CMC e *pools* enzimáticos no nível mais baixo (0,19% m/v), produzidos por ambos os micro-organismos (*P. simplicissimum e P. brevicompactum*).

Decidiu-se utilizar os dois *pools* enzimáticos (com diferentes características de atuação) e o biossurfatante em um único experimento e assim avaliar o efeito sinérgico de todos os parâmetros, a fim de se encontrar a melhor combinação para o pré-tratamento do efluente em questão.

4.8 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE COMBINANDO *POOLS* ENZIMÁTICOS E BIOSSURFATANTE

4.8.1 **Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR)**

Os pré-tratamentos foram realizados em *jar-test*, em sala climatizada, contendo efluente com elevada concentração de gordura. Foram avaliadas as variáveis: concentração e tipo de *pool* enzimático (o qual varia de acordo com o micro-organismo produtor) e concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Para tal, foi utilizado um planejamento experimental delineado por um Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR), conforme exposto na Tabela 4.23.

Tabela 4.23: Matriz codificada no planejamento experimental utilizando *pool* enzimático (*P. simplicissimum e P. brevicompactum*) e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1

Ensaios	Enzima	Biossurfatante
A	1	1
B	1	-1
C	-1	1
D	-1	-1
E	1,41	0
F	-1,41	0
G	0	1,41
H	0	-1,41
I	0	0
J	0	0
K	0	0
L	controle	

Os valores reais e codificados das variáveis estão representados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24: Valores reais e codificados das variáveis estudadas: concentração de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (BS) e *pool* enzimático (E) produzido pelos fungos *P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*

Variável		Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
BS (mg/L)		0	7	24	41	48
E (% m/v)	*P. simplicissimum*	0	0,08	0,25	0,42	0,5
	P. brevicompactum	0,5	0,42	0,25	0,08	0

As faixas de concentrações escolhidas para o *pool* enzimático e biossurfatante foram determinadas de acordo com os ensaios preliminares de inibição e biodegradabilidade anaeróbia. O lodo anaeróbio apresentou inibição ao se adicionar concentrações superiores a 0,5 % m/v de *pool* produzido pelo fungo *P. simplicissimum* e de 0,2% m/v para o *pool* produzido pelo fungo *P. brevicompactum*. Portanto, a adição máxima dos *pools* foi igual a 0,5%. Em relação ao biossurfatante, concentrações até a CMC não demonstraram efeito inibitório, sendo esta escolhida como concentração máxima.

4.8.2. **Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia**

O efluente bruto para esta etapa apresentava DQO de 14408 mg/L e 2400 mg O&G/L, sendo diluído 2 vezes com água destilada, para se aproximar das concentrações de O&G utilizadas nos experimentos anteriores. Os experimentos foram conduzidos em becheres de 500 mL contendo 300 mL de volume total constituído de efluente bruto, biossurfatante e/ou *pool* enzimático, com agitação (150 rpm) e temperatura (30º C) controladas, durante 4 horas. Após este período era colocado em contato com o lodo anaeróbio na proporção de 1:1 (SSV:DQO), assim como nos testes de biodegradabilidade anaeróbia.

Alíquotas da mistura eram retiradas antes do contato com o lodo anaeróbio para quantificação da DQO total e após o período de reação (encerramento da produção de biogás) para análise da DQO solúvel residual.

A avaliação do pré-tratamento em termos de biodegradabilidade foi monitorada em quatro bateladas sequenciais, sendo avaliada através da medida de eficiência de remoção de DQO e produção de biogás. O mesmo lodo anaeróbio foi utilizado em todas as bateladas realizadas, sendo separado por sedimentação ao final de cada uma delas e reutilizado na seguinte.

Para verificar qual condição apresentava maior efeito sobre a produção específica de metano, as respostas obtidas nos ensaios foram submetidas a um tratamento estatístico, adotando-se um nível de significância de 0,1, ou seja, 90% de confiança.

4.8.3. **Resultados e discussão**

Nas Tabela 4.25 e 4.26 são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia conduzidos com efluente bruto e concentrações dos *pools* enzimáticos e biossurfatante delineadas pelos DCCR no primeiro e segundo, e no terceiro e quarto contatos, respectivamente, com o lodo anaeróbio.

Ao finalizar a primeira, segunda e terceira bateladas, os frascos foram deixados em repouso por cerca de 12 h (*overnight*) para sedimentação do lodo anaeróbio e substituição do efluente (retirada do sobrenadante e adição de igual volume de efluente nas condições do planejamento) para início da segunda, terceira e quarta bateladas.

Tabela 4.25: Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com adição de biossurfatante e *pools* enzimáticos (*P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*) em bateladas sequenciais

Ensaios	DQO_T inicial (mg/L)	DQO_S final (mg/L)	DQO removida (mg/L)	Volume biogás (mL)	Volume metano (mL)	Produção Específica de Metano (L CH_4/ g DQO remov.)
			1ª Batelada			
A	6983±188	267±8	6716	90±10	76	0,126
B	6783±123	273±9	6510	123±8	108	0,185
C	5913±88	270±1	5643	109±8	94	0,185
D	6075±90	208±5	5867	112±11	94	0,178
E	7008±58	253±7	6756	145±4	125	0,205
F	6342±123	242±6	6100	134±12	114	0,207
G	7283±194	272±2	7011	133±5	114	0,180
H	7175±106	256±7	6919	125±18	103	0,166
I	6675±35	249±8	6426	130±13	104	0,179
J	6700±75	288±7	6412	123±3	99	0,172
K	6763±194	262±9	6500	131±6	108	0,184
L	6525±66	307±2	6218	110±5	94	0,167
			2ª Batelada			
A	8400±131	195±6	8205	116±5	94	0,127
B	8360±20	192±14	8168	105±10	84	0,114
C	7780±164	181±6	7599	91±6	72	0,105
D	7180±92	163±3	7017	104±3	83	0,132
E	7720±28	205±4	7515	113±7	91	0,135
F	7767±23	167±3	7600	104±4	83	0,122
G	7093±58	161±6	6932	111±3	89	0,142
H	7200±20	180±7	7020	120±5	98	0,155
I	8087±50	206±2	7881	101±2	81	0,114
J	8260±20	198±9	8062	108±6	90	0,124
K	8060±72	162±1	7898	112±6	90	0,127
L	8940±20	170±3	8770	94±5	77	0,097

Verifica-se que a DQO inicial em cada uma das bateladas apresentou baixa variação, obtendo-se valores médios de 6685 ± 418 mg/L, 7904±561mg/L, 8091±736 mg/L e 8752±598 mg/L na primeira, segunda, terceira e quarta bateladas. A manutenção de valores iniciais de DQO similares é importante para que efeitos de diferentes cargas orgânicas iniciais sejam descartados na análise dos resultados de remoção de DQO e produção de biogás.

Nota-se um aumento da DQO inicial do ensaio L (Controle) das primeiras bateladas para a quarta. Isto pode ser explicado pela deposição de sólidos no recipiente em que o

efluente foi coletado, ressuspensos no ato da homogeneização do efluente, contribuindo para o aumento da DQO inicial do Controle. Nos demais ensaios tal fato não ocorreu.

Tabela 4.26: Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia com adição de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 e *pools* enzimáticos (P. *simplicissimum e P. brevicompactum*) em bateladas sequenciais

Ensaios	DQO_T inicial (mg/L)	DQO_S final (mg/L)	DQO removida (mg/L)	Volume biogás (mL)	Volume metano (mL)	Produção Específica De Metano (L CH_4/ g DQO remov.)
			3ª Batelada			
A	9053±95	155±7	8898	129±5	110	0,138
B	8490±71	157±9	8333	125±19	106	0,141
C	7270±42	143±4	7127	108±5	95	0,148
D	8780±28	110±3	8670	166±6	144	0,185
E	7120±85	124±1	6996	124±9	108	0,172
F	8270±42	136±8	8134	153±6	134	0,183
G	9350±42	128±6	9222	146±27	129	0,155
H	8150±71	135±5	8016	131±19	115	0,159
I	7527±46	136±6	7391	117±3	103	0,155
J	7353±42	130±6	7224	111±17	94	0,144
K	7553±81	149±3	7404	106±6	93	0,140
L	8170±42	180±1	7990	61±2	54	0,075
			4ª Batelada			
A	8825±66	227±8	8598	125±3	94	0,121
B	8542±95	212±7	8330	119±5	99	0,133
C	8508±38	195±5	8313	130±8	100	0,134
D	8167±52	177±4	7990	132±6	96	0,134
E	8117±29	164±6	7953	116±2	87	0,121
F	8783±29	170±4	8613	132±4	103	0,133
G	9150±90	203±7	8947	132±2	103	0,128
H	8467±38	184±1	8283	121±7	99	0,134
I	8675±75	169±5	8506	135±7	104	0,135
J	8958±14	193±5	8765	126±9	105	0,132
K	8442±43	184±4	8258	129±1	98	0,131
L	10392±115	283±3	10109	87±6	67	0,074

Com relação à DQO final, pode-se observar que praticamente não houve diferença entre as condições avaliadas nas três primeiras bateladas, incluindo o ensaio com efluente bruto (ensaio L - Controle), obtendo-se uma DQO final de 307 ± 2 mg/L, 182±17 mg/L e 140±18 mg/L para a primeira, segunda e terceira bateladas. Mesmo com a reutilização do lodo por quatro vezes as eficiências de remoção de DQO mantiveram-se acima de 95%. Da segunda

batelada em diante uma remoção de DQO pouco maior (97%) do que a verificada na primeira batelada pode ser atribuída à adaptação dos micro-organismos aos constituintes do efluente, fato também observado por Valladão *et al*. (2011) e citado por outros autores (PALATSI *et al*., 2011; CIRNE *et al*., 2007; PEREIRA *et al*., 2004). Embora o lodo empregado seja oriundo de um reator anaeróbio em operação na mesma indústria em que o efluente foi coletado, este era alimentado com efluente contendo baixos teores de gordura, após um flotador, e sem adição de enzimas e biossurfatante.

No entanto, na quarta batelada se percebe a contribuição do acúmulo de gordura na biomassa, pois apesar da DQO final ainda se manter baixa (197 ± 33 mg/L e a remoção elevada (97,8 ± 0,3%), os valores de DQO final aumentaram consideravelmente em relação à terceira batelada (aumentos de 19 a 38%). Outra observação é que já se percebe uma pequena diferença entre as condições avaliadas, pois o desvio-padrão entre os valores de DQO final aumenta de 9,5% para 16,8% da primeira para a quarta batelada. Comparando a DQO final da condição Controle (283 ± 6 mg/L) com a média das demais condições (189 ± 19 mg/L), verifica-se um valor quase 50% maior para o Controle (ensaio L).

Na primeira batelada, o ensaio E (0,5% de *pool* produzido por *P. simplicissimum* e 24 mg/L de biossurfatante) foi o que resultou no maior volume de metano (125 mL), 25% maior que no ensaio L (Controle). Já em relação à produção específica de metano (PEM), destacou-se, além do ensaio E, o ensaio F (0,5 % do *pool* produzido por *P. brevicompactum* e 24 mg/L de biossurfatante). Ou seja, na primeira batelada os dois *pools* em separado, acrescidos da mesma concentração de biossurfatante, demonstraram melhores produções específicas de metano.

Em relação ao volume de metano produzido na segunda batelada, nenhum dos ensaios teve destaque, porém o ensaio L (Controle) apresentou queda no volume de metano (18%) quando comparado à primeira batelada. A condição A manteve a PEM da primeira para a segunda batelada em 0,127±0,0005 L CH_4/g $DQO_{removida}$. Nas demais condições (B a K), a PEM é maior na primeira batelada (0,184 ± 0,013 L CH_4/g $DQO_{removida}$), reduzindo na segunda batelada para 0,127 ± 0,015 L CH_4/g $DQO_{removida}$. Na terceira batelada, o volume de metano gerado no ensaio L (Controle) foi 43% e 30% menor do que o obtido na primeira e segunda bateladas.

Como a eficiência de remoção de DQO era alta (> 95%) em todas as bateladas, provavelmente o material gorduroso acumulou no lodo anaeróbio e reduziu a atividade dos micro-organismos. Outra possibilidade para esta redução seria o acúmulo de compostos

inibitórios, como ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), produzidos na etapa de hidrólise e a consequente redução da taxa de produção de metano pela população metanogênica (VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2009; ANGELIDAKI e AHRING, 1992; HANAKI, MATSUO e NAGASE, 1981).

Valladão (2009) verificou resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, com uma redução de 43% na produção de biogás com a reutilização do lodo em efluentes de abate de aves sem pré-tratamento, enquanto nos experimentos com efluentes pré-tratados (hidrolisados) a produção se manteve elevada após três contatos.

Diferenças mais acentuadas entre as condições avaliadas foram observadas ao se analisar a produção específica de metano (PEM) obtida ao final dos experimentos. Observa-se que a condição A (condição em que ambos enzima e biossurfatante estão presentes em níveis elevados) apresenta a menor PEM na primeira batelada (0,126 L CH_4/g $DQO_{remov.}$), menor inclusive que na condição Controle (0,167 L CH_4/g $DQO_{remov.}$). Este resultado, que se mantém até na quarta batelada (média de todas as bateladas de 0,128 ± 0,007 L CH_4/g $DQO_{remov.}$), se deve à combinação de 0,5% (m/v) de *pools* enzimáticos, com maior proporção de *P. simplicissimum*, e 41 mg/L de biossurfatante. O *pool* de *P. simplicissimum* contém elevada atividade proteásica que, associada a uma concentração elevada de biossurfatante, contribuiu para uma menor atividade dos micro-organismos.

Na terceira batelada, ocorreu um aumento da produção de metano em todas as condições, no entanto, a partir daí verifica-se um comportamento diferenciado em função da composição do meio: nos experimentos conduzidos com menores concentrações de enzima e biossurfatante ou com somente uma das enzimas e concentrações medianas de biossurfatante (condições D, E e F) a PEM aumenta consideravelmente para 0,180 ± 0,007 L CH_4/g $DQO_{remov.}$ e decai novamente na quarta batelada para 0,129 ± 0,007 L CH_4/g $DQO_{remov.}$. Já nas demais condições (B, C, G, H, I, J, K), a PEM aumenta menos na terceira batelada (0,132 ± 0,002 L CH_4/g $DQO_{remov.}$), mas praticamente se mantém até o fim dos experimentos em 0,146 ± 0,004 L CH_4/g $DQO_{remov.}$, na quarta batelada. Na condição Controle (condição L - somente efluente), a PEM diminui gradativamente com a reutilização do lodo anaeróbio, sofrendo uma redução de 56% da primeira para a quarta batelada, chegando a 0,074 L CH_4/g $DQO_{remov.}$.

Valladão (2009) observou o efeito de dois fenômenos concorrentes durante a degradação da matéria orgânica no pré tratamento enzimático de efluente com alto teor de gordura com influência direta na PEM: o efeito da aclimatação da biomassa aos constituintes

do efluente e do preparado enzimático sólido (PES) e o efeito do acúmulo de gordura na biomassa. A ocorrência destes dois fenômenos resultou em um aumento na produção de metano nos experimentos com efluente bruto (Controle) da primeira para a segunda batelada, mantendo-se praticamente estável na terceira batelada. Os autores sugeriram que tal fato ocorreu devido a uma adaptação da biomassa aos constituintes do meio, superando o efeito do acúmulo de gordura na biomassa.

O acúmulo de gordura resulta em um decréscimo acentuado da PEM nos experimentos com efluente bruto, já nos ensaios com efluente pré-tratado, a PEM varia de 0,105 a 0,207 L CH_4/g $DQO_{remov.}$, em função de uma adaptação da biomassa aos constituintes do meio e do baixo acúmulo de gordura. O pré-tratamento reduz consideravelmente a matéria orgânica particulada (partículas de gordura em suspensão) no efluente, restando praticamente matéria orgânica solúvel, mais prontamente assimilável pelos micro-organismos (DAMASCENO, CAMMAROTA e FREIRE, 2012).

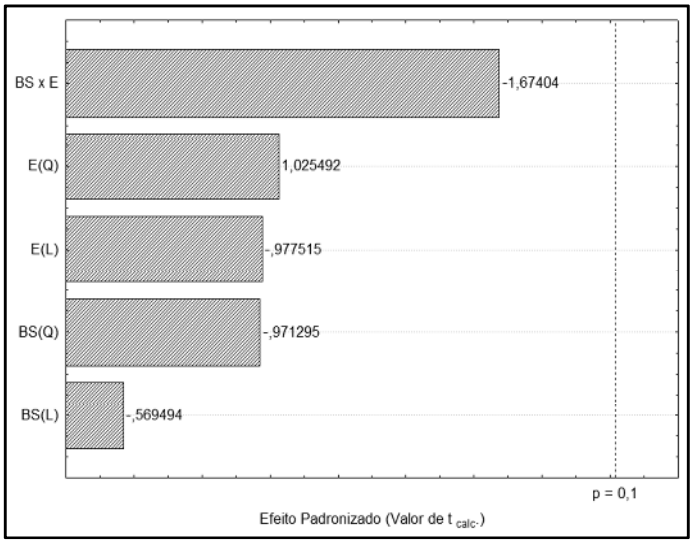
Os resultados foram então analisados pelo tratamento estatístico, onde foi constatado que nenhum nenhuma variável apresentou efeito significativo, dentro da faixa de concentrações estudadas, sobre a PEM do lodo na primeira e segunda bateladas (Figura 4.13). Enquanto a variável Enzima passou a ser significativa na terceira batelada e todas as variáveis, bem como suas interações (com exceção da concentração de biossurfatante na forma quadrática), demonstraram influência direta sobre a variável resposta na quarta batelada (Figura 4.14).

Tal resultado se deve a uma estabilização do processo de degradação anaeróbia frente aos vários efeitos possíveis: a adaptação dos micro-organismos aos constituintes do meio, o acúmulo de gordura na biomassa (especialmente na condição Controle) e a ação hidrolítica e emulsificante do biossurfatante (nas demais condições), conforme já comentado.

Fica evidente, sobretudo na quarta batelada, a influência do pré-tratamento sobre a PEM, uma vez que o efeito do acúmulo de gordura na biomassa interfere negativamente no ensaio Controle. Valladão, Freire e Cammarota (2007) estudaram a aplicação de *pool* enzimático produzido por fermentação em estado sólido pelo fungo *P. restrictum* no pré-tratamento de efluente de abate de aves. Testes de hidrólise enzimática foram realizados variando as concentrações do *pool* de 0,1 a 1,0 % m/v em efluente contendo de 150 a 1200 mg O&G/L. Dentre as combinações, a aplicação de 0,1 % de *pool* enzimático durante 4 horas em efluente contendo 1200 mg O&G/L resultou em eficiência de remoção de DQO de 85% contra 53% da condição sem pré-tratamento (Controle) e maior produção de biogás (175 ml

contra 37 ml do Controle), indicando a hidrólise enzimática como uma estratégia eficaz para alcançar maiores taxas de produção de metano em menores intervalos de tempo em efluentes gordurosos.

1ª Batelada



2ª Batelada

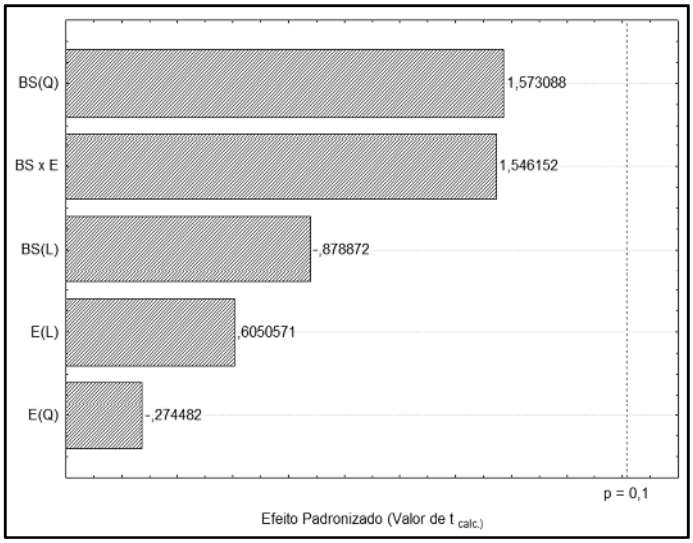
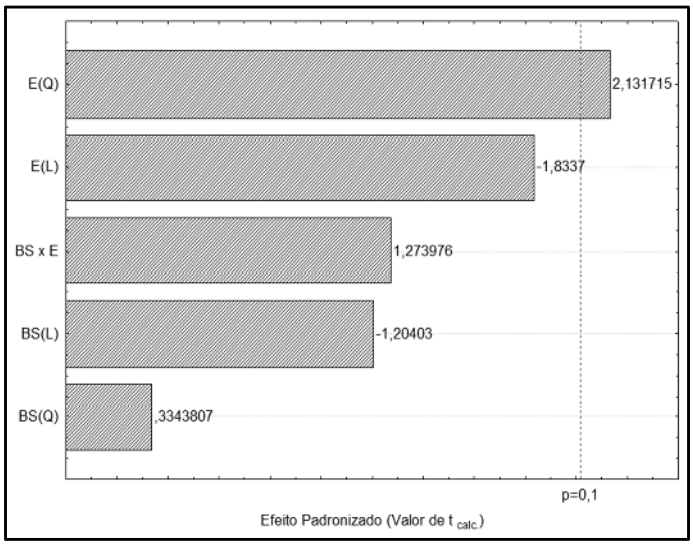


Figura 4.13: Efeitos padronizados para a produção específica de metano (PEM) utilizando biossurfatante e *pools* enzimáticos (*P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*) para a 1ª e 2ª bateladas.

3ª Batelada



4ª Batelada

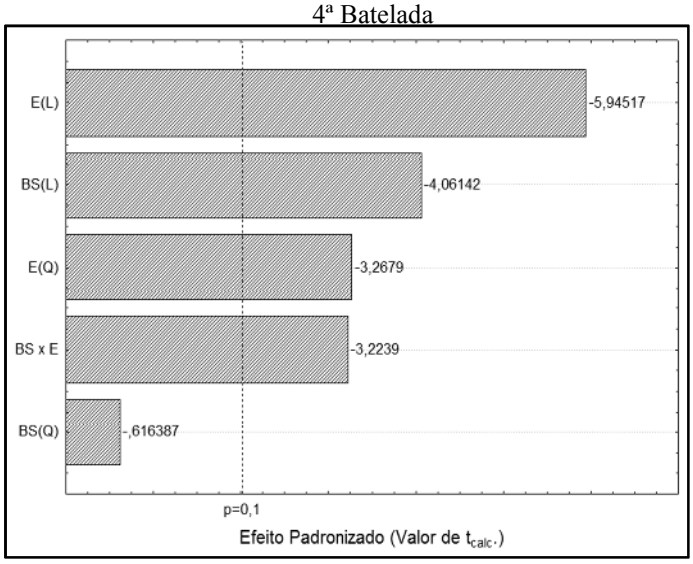


Figura 4.14: Efeitos padronizados para a produção específica de metano (PEM) utilizando biossurfatante e *pools* enzimáticos (*P. simplicissimum* e *P. brevicompactum*) para a 3ª e 4ª bateladas.

Em outro estudo, Valladão *et al.* (2011) verificou maior acúmulo de gordura em reator UASB tratando efluente de abate de aves com 800 mg O&G/L sem pré-tratamento enzimático, o que resultou em inúmeros entupimentos e formação de escuma no topo do reator Controle, fato não observado no reator que recebia efluente pré-hidrolisado com *pool* enzimático produzido por fermentação em estado sólido do fungo *P. restrictum*, com 270 dias de operação, confirmando a eficácia do pré-tratamento enzimático de efluentes com alto teor de gordura.

Após a quarta batelada, na qual ficou evidenciada a influência do pré-tratamento na produção específica de metano, uma nova batelada foi iniciada para as condições D (baixas

concentrações de enzima e biossurfatante), F (*pool* de *P. brevicompactum* e concentração mediana de biossurfatante) e H (proporções iguais dos dois *pools* enzimáticos), nas quais se verificaram maiores volumes de biogás e produção específica de metano em relação ao Controle (Condição L). Desta forma, pretendia-se escolher a melhor condição de pré-tratamento para anteceder a unidade de tratamento biológico, um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB).

Como pode ser visualizado na Figura 4.15, os ensaios conduzidos nas três condições apresentaram comportamento similar para a PEM ao longo do tempo, finalizando com valores três vezes maiores do que a PEM do Controle.

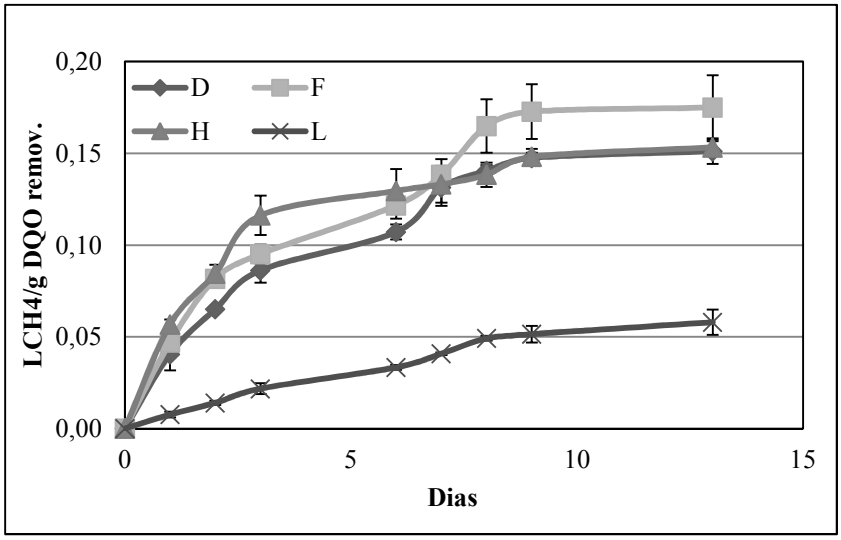


Figura 4.15: Produção Específica de Metano (PEM) ao longo dos dias na quinta batelada, com as condições D, H e F (maiores PEM no quarto contato) e L (controle).

Ao cessar a produção de biogás nestes experimentos, o conteúdo dos frascos foi submetido à análise de O&G para se verificar a concentração residual de material gorduroso (em suspensão no meio e adsorvida ao lodo anaeróbio). Nos ensaios D, F e H verificou-se uma menor concentração residual de O&G, especialmente na condição F, enquanto a condição Controle apresentou a maior concentração residual de O&G (Figura 4.16).

Comparando as concentrações obtidas com a concentração inicial presente no efluente bruto (1468 mg O&G/L, em média), pode-se calcular remoções de O&G de 51 a 90% nas condições com efluente pré-tratado e somente 1% na condição Controle com efluente bruto. Os resultados das análises de O&G tornam visível a influência do pré-tratamento sobre o

acúmulo de gordura no meio reacional após sucessivas bateladas, o que pode levar, a longo prazo, ao colapso do sistema de tratamento biológico.

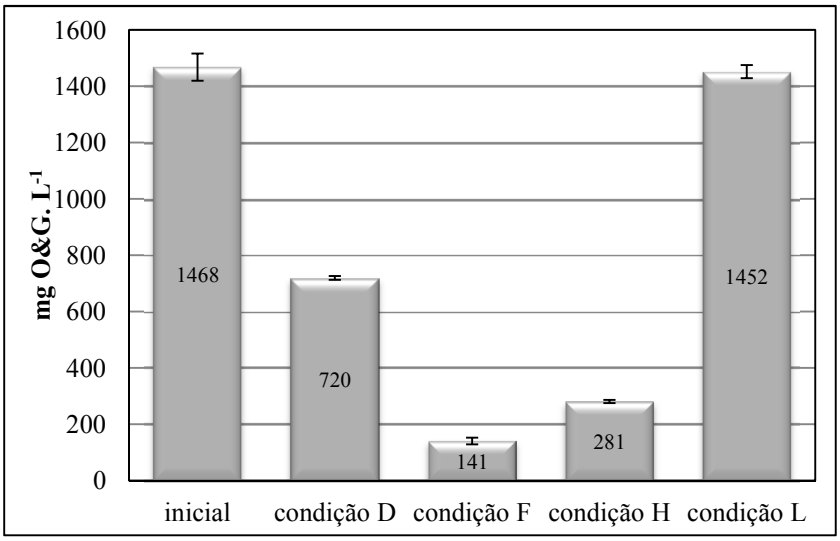


Figura 4.16: Concentração residual de óleos e graxas (O&G) ao término da quinta batelada, com as condiçoes D, F, H e controle (L).

O ensaio F (com 0,5 % de *pool* enzimático produzido pelo fungo *P. brevicompactum* e biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1, na metade da concentração da CMC) foi o que demonstrou melhor efeito sinérgico de disponibilização/hidrólise da gordura na atuação conjunta de biossurfatante e *pools* enzimáticos, levando a bons resultados de remoção de DQO, produção de metano e baixo acúmulo de gordura, sendo então esta condição escolhida para pré-tratamento do efluente de abate de aves.

4.9 MONITORAMENTO DOS BIORREATORES ANAERÓBIOS

A operação de dois biorreatores anaeróbios contínuos do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), em escala de bancada, para o tratamento de efluente de abatedouro de aves foi iniciada após a seleção das condições ideais de pré-tratamento enzimático/biossurfatante.

4.9.1 **Características e procedimento de operação dos reatores UASB de bancada**

Os biorreatores, construídos em acrílico, eram constituídos de um tubo vertical com 8,5 cm de diâmetro e 26,1 cm de altura, e 1,08 L de volume útil, conforme detalhado na Figura 4.17.

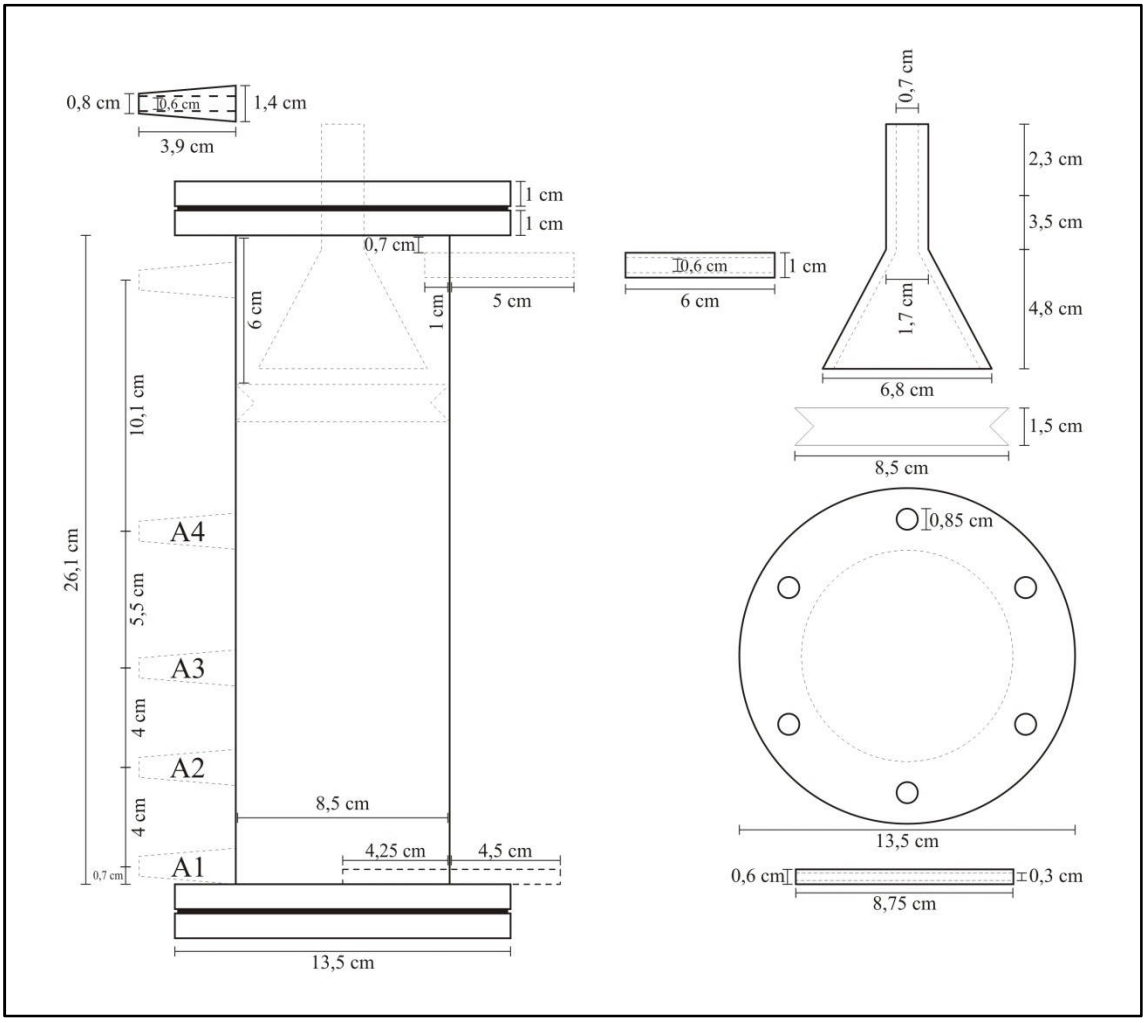


Figura 4.17: Desenho dos biorreatores UASB utilizados no trabalho.

Os biorreatores eram equipados com um separador trifásico (sólido-líquido-gás) em forma de funil invertido, com diâmetro igual a 6,8 cm. Um anel defletor com ângulo de 45° foi instalado a 19,35 cm de altura, ficando a 0,5 cm de distância do separador trifásico. Os pontos de amostragem estavam localizados a diferentes alturas da base dos biorreatores conforme ilustrado na Figura 4.17, sendo que o amostrador A1 foi inutilizado pela adição de esferas de porcelana, com diâmetro médio de 0,7 cm, na base dos biorreatores necessárias para tornar a distribuição do efluente uniforme.

Os biorreatores operaram a 30 ± 1°C. A alimentação era preparada duas vezes ao dia (exceto finais de semana) para evitar a deterioração da mesma, permanecendo sob agitação para evitar a deposição de material sólido. Os biorreatores eram alimentados continuamente em sua base (fluxo ascendente), sendo que um biorreator recebia efluente pré-tratado (denominado Teste), enquanto outro era alimentado com efluente bruto (denominado Controle).

Os parâmetros de monitoramento do reator foram: pH, vazão, sólidos suspensos totais, fixos e voláteis, demanda química de oxigênio, óleos e graxas, ácidos voláteis totais, alcalinidade total e produção e composição de biogás (APHA, 2005), de acordo com a Tabela 4.27, sendo os resultados encontrados analisados estatisticamente utilizando-se o *software Statistica* 5.0, através do teste *t-Student*, com 95% de confiança (nível de significância de 5%, $\alpha = 0,05$).

Tabela 4.27: Variáveis analisadas com seus respectivos locais e periodicidade

Parâmetro	Periodicidade	Local
Temperatura	Diária	Sala/Reatores
Vazão	Diária	Saída dos reatores
Produção de biogás	Diária	Saída de gás dos reatores
pH	Diária	Entrada e saída dos reatores
DQO total	3 vezes por semana	Entrada e saída dos reatores
DQO solúvel	3 vezes por semana	Entrada e saída dos reatores
Óleos & Graxas	semanal	Entrada e saída dos reatores
Ácidos Voláteis Totais	semanal	Saída dos reatores
Alcalinidade Total	semanal	Saída dos reatores
Análise do percentual de metano	quinzenal	Biogás
Perfil de Sólidos	Final dos regimes	Reatores
Acúmulo de gordura	Final dos regimes	Lodo anaeróbio
Avaliação da comunidade microbiana	Final dos regimes	Lodo anaeróbio

A saída de gás dos biorreatores era ligada a medidores de biogás da marca Ritter (*Milligascounter*), que apresentavam painel digital com fator de calibração programada e precisão de 3%.

O lodo anaeróbio utilizado como inóculo nos bioreatores UASB foi coletado de um reator UASB em escala industrial, operando na mesma estação de tratamento em que era

coletado o efluente. Em ambos os reatores foram adicionados 360 mL do lodo contendo 14,7g/L de sólidos suspensos voláteis.

Os reatores operaram durante 187 dias, sendo este período dividido em três etapas: adaptação, 1º regime e 2º regime. No final de cada regime foram coletadas amostras de lodo nos diferentes amostradores para a determinação de sólidos voláteis, percentual de O&G aderidos ao lodo e avaliação da comunidade microbiana.

O reator alimentado com efluente bruto foi denominado Controle e o reator alimentado com efluente pré-tratado com 0,5 % m/v de *pool* enzimático produzido por P. brevicompactum e 27 mg/L de biossurfatante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 (metade da CMC) foi denominado Teste. Os reatores operaram durante 187 dias, sendo os 44 primeiros dias destinados à adaptação do lodo anaeróbio ao efluente de abate de aves, período em que se verificou um aumento progressivo da eficiência de remoção de DQO.Após o período de adaptação, os reatores foram submetidos a dois regimes de alimentação. No primeiro regime, que durou 68 dias, adotou-se um tempo de retenção hidráulica (TRH) de 20 h, resultando em uma carga orgânica volumétrica (COV) média de 6,3±0,6 kg DQO/m^3.d para o reator Controle e 6,0±1,0 kg DQO/m^3.d para o reator Teste. No segundo regime, que durou 75 dias, o TRH foi reduzido para 12 h, obtendo-se uma COV de 10,8±1,2 kg DQO/m^3.d no reator Controle e de 11,1±1,3 kg DQO/m^3.d no reator Teste.

4.9.2 **Resultados e discussão**

A Tabela 4.28 apresenta um resumo dos resultados obtidos nos dois regimes de operação dos reatores UASB de bancada.

4.9.2.1. Carga Orgânica Volumétrica (COV)

A carga orgânica volumétrica (COV) empregada nos dois regimes de operação dos reatores Controle e Teste é apresentada nas Figuras 4.18 e 4.19. Os valores obtidos nos dois reatores para cada regime ficaram próximos (Tabela 4.28), fato importante para se descartar qualquer influência da carga orgânica inicial sobre a eficiência de operação dos reatores.

Nota-se certa variação, em ambos os reatores, ao longo do tempo. Isto é decorrente da utilização de efluente industrial, o qual apresenta variabilidade a cada coleta, difícil de ser controlada.

Tabela 4.28: Resumo dos resultados obtidos durante a operação dos reatores Controle e Teste.

Parâmetros	Controle		Teste	
	1º regime	2º regime	1º regime	2º regime
COV (kg DQO/m^3.d)	6,3±0,6^{AC}	10,8±1,2^{BC}	6,0±1,0^{AC}	11,1±1,3^{BC}
pH entrada	6,6±0,2^{AC}	6,7±0,4^{AC}	6,5±0,3^{AC}	6,7±0,4^{BC}
pH saída	7,6±0,4^{AC}	7,4±0,4^{BC}	7,6±0,3^{AC}	7,4±0,3 ^{BC}
AVT (mg HAc/L)	196±42^{AC}	268±96^{AC}	181±25^{AC}	222±79^{AC}
ALC (mg $CaCO_3$/L)	914±68^{AC}	983±243^{AC}	998±160^{AC}	976±247^{AC}
AVT/ALC	0,21±0,03^{AC}	0,28±0,08^{AC}	0,18±0,02^{AC}	0,23±0,1^{AC}
DQO total entrada (mg/L)	5231±520^{AC}	5377±612^{AC}	5000±829^{AC}	5537±668^{AC}
DQO total saída (mg/L)	546±206^{AC}	1470±806^{BC}	480±223^{AC}	489±238^{AD}
Remoção DQO total (%)	89,1±4,4^{AC}	72,5±15,6^{BC}	90,2±5^{AC}	91,2±4^{AD}
DQO solúvel entrada (mg/L)	1415±147^{AC}	1487±194^{AC}	1612±200^{AD}	1580±209^{AC}
DQO solúvel saída (mg/L)	190±55^{AC}	269±87^{BC}	166±61^{AC}	154±51^{AD}
Remoção DQO solúvel (%)	86,1±4,4^{AC}	82,0±6,6^{BC}	89,5±4^{AD}	90,4±4^{AD}
O&G entrada (mg/L)	1243±191^{AC}	1240±119^{AC}	1229±185^{AC}	1185±97^{AC}
O&G saída (mg/L)	164±37^{AC}	626±337^{BD}	49±31^{AC}	50±32^{AC}
Remoção O&G (%)	87±3^{AC}	48±29^{BC}	96,0±3^{AD}	95,8±3^{AD}
O&G escuma (mg/L)	1642±2095^{AC}	10548±2773^{BC}	155±8^{AD}	904±564^{BD}
Produção Biogás$_{CNTP}$ (mL/d)	436,3	709,5 143,9*	598,5	662,2
CH_4 (%)	78±4^{AC}	70±5^{BC}	79±3^{AD}	80±2^{BD}
Produção Metano$_{CNTP}$ (mL CH_4/d)	340,3	496,7 100,7*	472,8	529,8
PEM$_{CNTP}$ (mLCH_4/g DQO$_{remov}$)	59,2	36,1 16,9	71,6	67,8

Teste t – α = 0,05, letras iguais significa semelhança estatística. Letras vermelhas, análise entre regimes; letras azuis, análise entre os reatores. * após 95 dias.

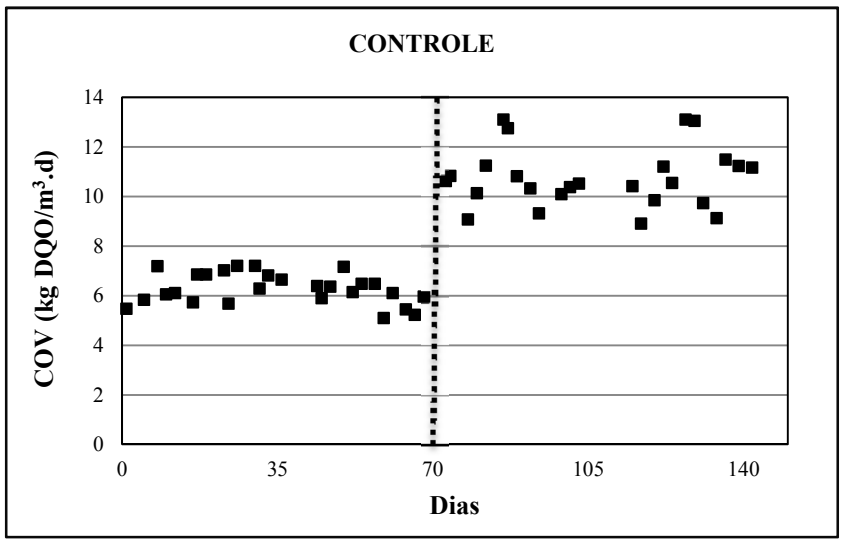


Figura 4.18: Carga Orgânica Volumétrica afluente ao reator Controle no 1º (pré marcação) e 2º (pós marcação) regimes.

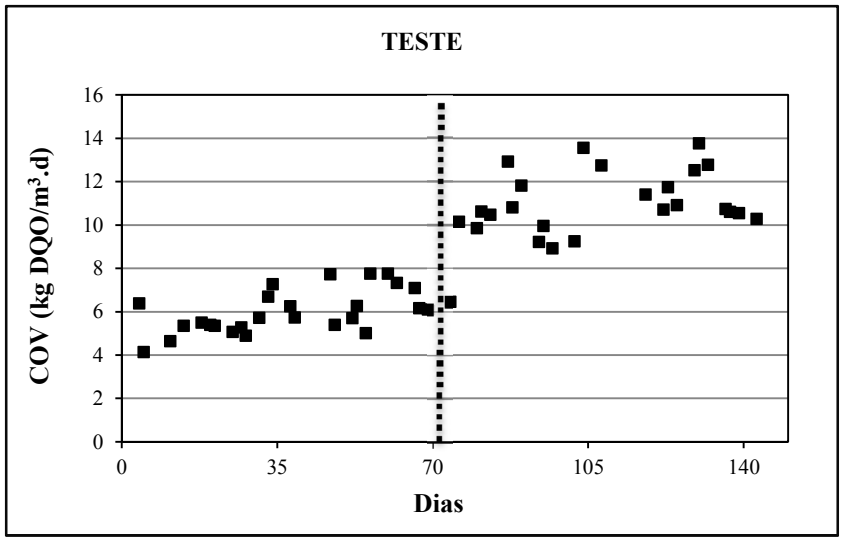


Figura 4.19: Carga Orgânica Volumétrica afluente ao reator Teste no 1º (pré marcação) e 2º (pós marcação) regimes.

De acordo com Sant´Anna Jr (2010), a carga aplicada aos reatores UASB é um parâmetro-chave, sendo comum para efluentes industriais cargas orgânicas variando de 5 a 15 kg DQO/m^3.d, dependendo de algumas características inerentes ao processo como a biodegradabilidade do efluente e a temperatura de operação, por exemplo (GRANT *et al.*, 2002). Para efluentes contendo de 2000 a 6000 mg/L de DQO e fração de sólidos insolúveis de 30 a 60%, as cargas orgânicas volumétricas ideais situam-se entre 4 e 6 kg DQO/m^3.d

(LETTINGA e HULSHOFF, 1991 *apud* DEL NERY *et al*., 2007). Assim, as cargas orgânicas utilizadas neste trabalho encontram-se dentro do limite operacional de reatores UASB.

4.9.2.2 pH, acidez volátil e alcalinidade

Nas Figuras 4.20 e 4.21 são apresentados os valores de pH de entrada (afluente) e de saída (efluente) dos reatores Controle e Teste, respectivamente. Vale ressaltar que os valores de pH afluente não eram ajustados, uma vez que eram próximos à neutralidade.

Os micro-organismos produtores de metano apresentam crescimento ótimo na faixa de pH entre 6,6 e 7,4, embora se possa conseguir estabilidade na formação de metano em uma faixa mais ampla de pH, entre 6,0 e 8,0. Valores de pH abaixo de 6,0 e acima de 8,3 devem ser evitados, uma vez que estes podem inibir por completo os micro-organismos formadores de metano (CHERNICHARO, 2007). Os valores de pH observados neste estudo permaneceram dentro da faixa recomendada (Tabela 4.28).

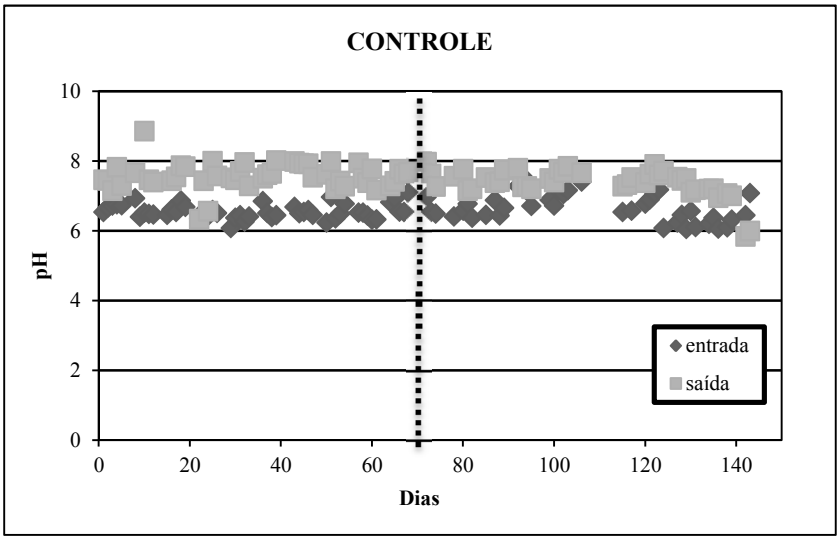


Figura 4.20: Valores de pH na entrada e saída do reator Controle durante o 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

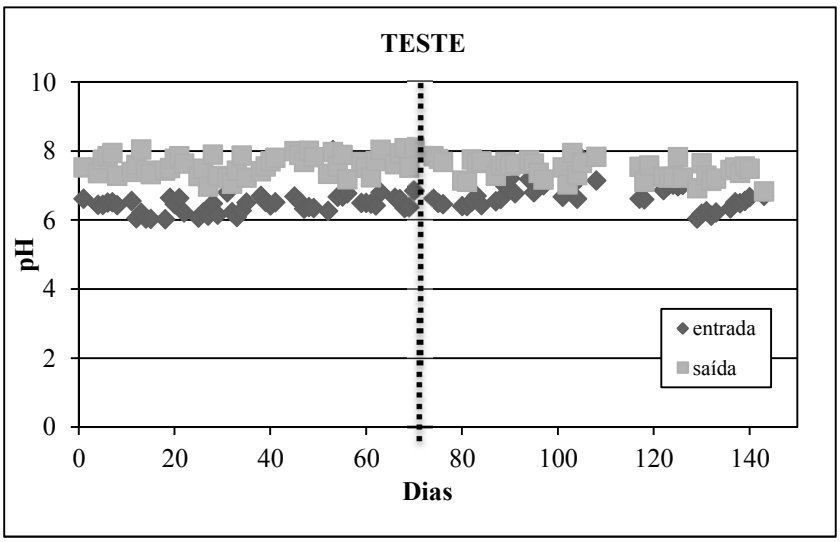


Figura 4.21: Valores de pH na entrada e saída do reator Teste durante o 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

As Figuras 4.22 e 4.23 apresentam a variação dos ácidos voláteis totais (AVT) e da alcalinidade total (ALC) analisadas no efluente dos reatores Controle e Teste.

A alcalinidade de uma solução é a medida de sua capacidade de neutralizar ácidos, resistir às mudanças de pH ou tamponar o sistema. Os principais íons responsáveis pela alcalinidade em meios aquosos sob tratamento anaeróbio são: HCO_3^-, CO_3^{2-} e OH^-, cujas concentrações são função do pH. Geralmente, o valor da alcalinidade é expresso em mg $CaCO_3$/L (usado para padronizar ácidos) (ANDERSON e YANG, 1992).

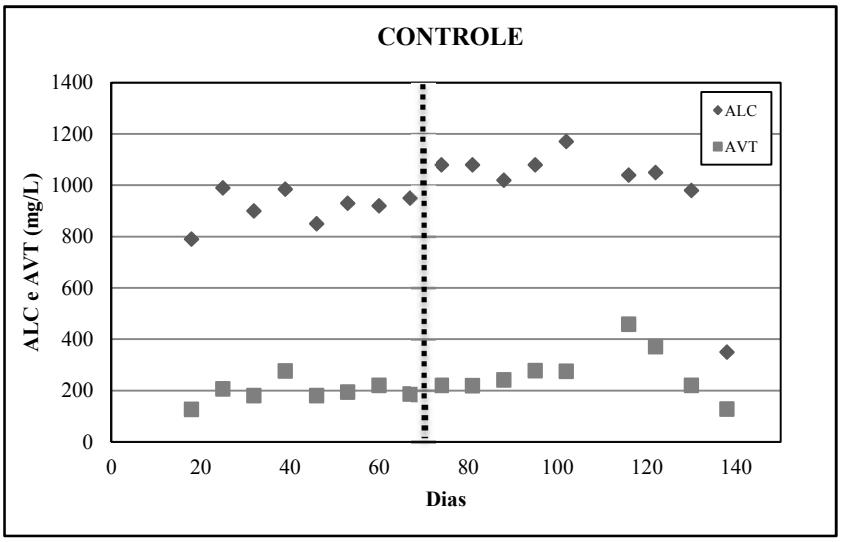


Figura 4.22: Alcalinidade Total e Ácidos Voláteis Totais no efluente do reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

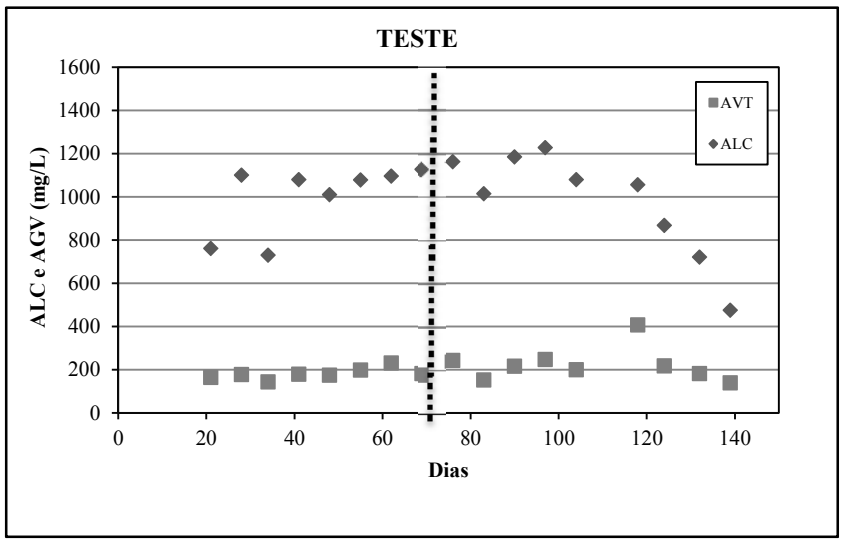


Figura 4.23: Alcalinidade Total e Ácidos Voláteis Totais no efluente do reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

Durante o 1º regime, percebe-se um comportamento semelhante para a alcalinidade total em ambos os reatores, que se mantém pouco variável. Já no 2º regime, embora as médias observadas permaneçam estatisticamente iguais (Tabela 4.28), a alcalinidade total nos dois reatores apresenta tendência de queda, provavelmente relacionada a um maior acúmulo de ácidos nos reatores.

Os ácidos voláteis totais, presentes no efluente dos reatores, como os ácidos acético, propiônico e butírico, derivados da decomposição dos compostos orgânicos durante a digestão, apresentaram-se praticamente constantes, tanto para o reator Controle como para o Teste, no primeiro regime. No segundo regime, nota-se discretas variações nos valores encontrados para os AVT, em ambos os reatores. No entanto, estas variações ainda permitem que as médias permaneçam estatisticamente iguais entre os reatores (Tabela 4.28).

A interação da alcalinidade com os ácidos voláteis durante a digestão anaeróbia fundamenta-se na capacidade da alcalinidade do sistema em neutralizar os ácidos formados no processo e também em tamponar o pH, na eventualidade de um acúmulo de ácidos voláteis (CHERNICHARO, 2007). Nas Figuras 4.24 e 4.25 é apresentada a variação da relação entre ácidos voláteis e alcalinidade (AVT/ALC) para o efluente dos reatores Controle e Teste, respectivamente.

Tanto no primeiro como no segundo regime, a relação AVT/ALC se mantém baixa, para ambos os reatores Controle e Teste, e dentro dos limites recomendados na literatura para a realização satisfatória da digestão anaeróbia, entre 0,1 e 0,5 mg HAc/mg $CaCO_3$

(CHERNICHARO, 1997). Os valores obtidos apresentaram semelhança na análise estatística entre reatores e regimes (Tabela 4.28).

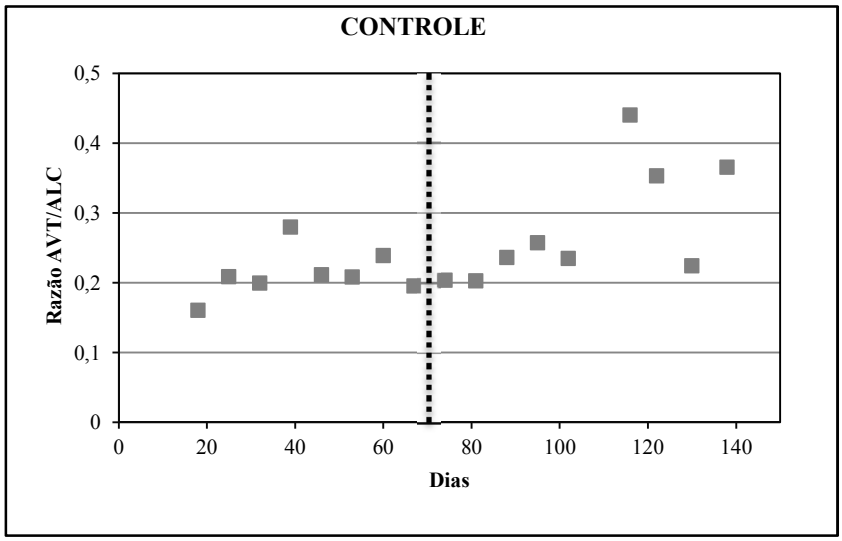


Figura 4.24: Valores da relação Ácidos Voláteis Totais e Alcalinidade para o reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

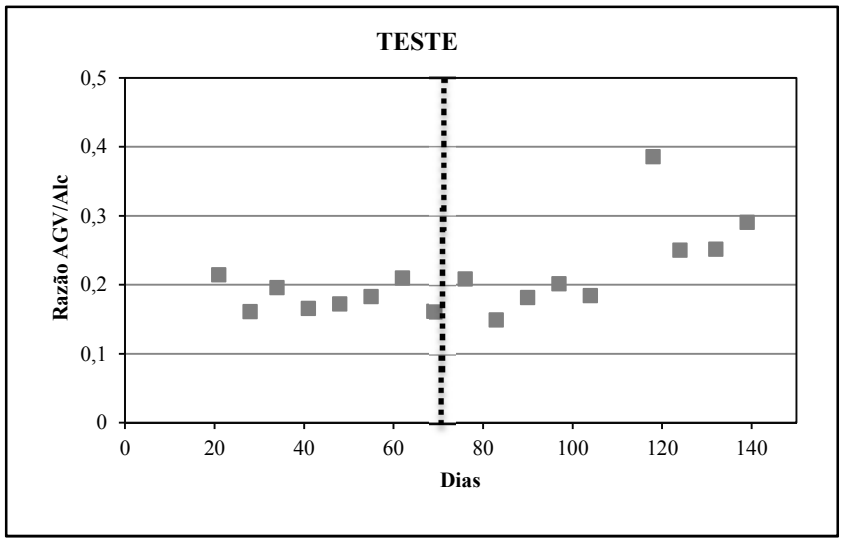


Figura 4.25: Valores da relação Ácidos Voláteis Totais e Alcalinidade para o reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes

4.9.2.3 Demanda química de oxigênio

A matéria orgânica presente nos efluentes pode se apresentar solúvel, na maioria das vezes rapidamente biodegradável, e em suspensão, de biodegradação mais lenta. O somatório destas frações corresponde à matéria orgânica total, que pode ser quantificada como demanda química de oxigênio. Os valores de DQO total na entrada e saída dos reatores Controle e Teste são apresentados na Tabela 4.28 e Figuras 4.26 e 4.27.

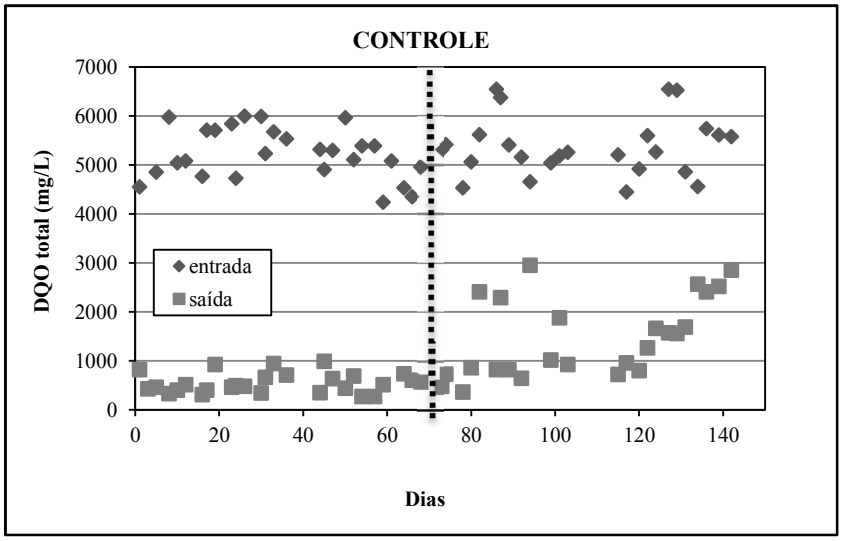


Figura 4.26: Variação da DQO total de entrada e saída do reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

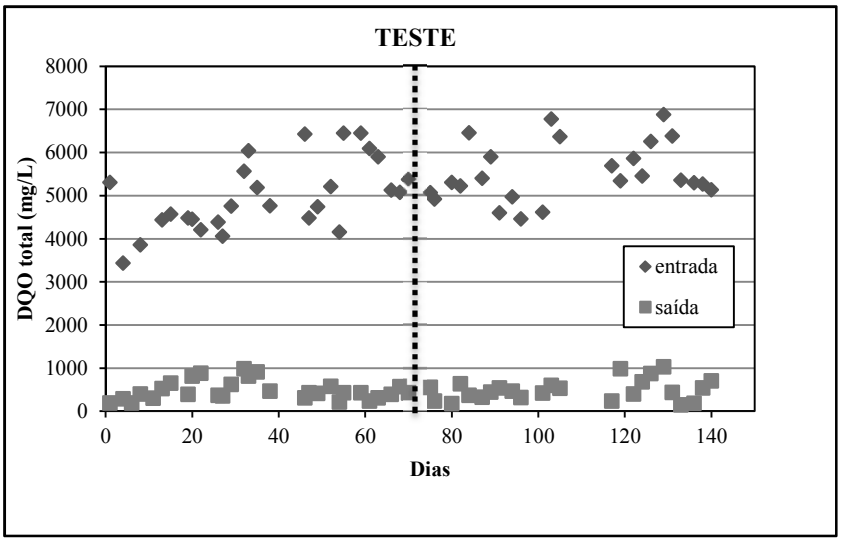


Figura 4.27: Variação da DQO total de entrada e saída do reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

Nas Figuras 4.26 e 4.27 nota-se que houve variações na DQO total afluente para os dois reatores, reflexo da variabilidade do efluente industrial, como já citado anteriormente. Vale ressaltar que os valores da DQO afluente foram próximos nos dois reatores (5304±103 mg/L – média dos dois regimes para o reator Controle e 5269±380 mg/L – média dos dois regimes para o reator Teste), podendo-se descartar a influência de diferentes valores de carga inicial sobre o comportamento dos sistemas de tratamento.

O reator Controle apresentou DQO total efluente média 2,7 vezes maior no 2º regime de operação, enquanto o reator Teste manteve valores estatisticamente iguais no 1º e 2º regimes (Tabela 4.28). Nas Figuras 4.26 e 4.27 pode ser visualizada a variabilidade da DQO total efluente do reator Controle, sobretudo no 2º regime, quando a carga orgânica volumétrica foi aumentada. Neste regime, cinco entupimentos da tubulação de saída do efluente ocorreram devido ao acúmulo de sólidos no topo do reator, provavelmente relacionados à adsorção física de gorduras à superfície do lodo, seguida de flotação das partículas para a superfície. Vários autores citam como desvantagem do tratamento de efluentes com alto teor de gordura em reatores UASB a flotação e consequente *washout* do lodo, antes mesmo da ocorrência de inibição por parte dos micro-organismos anaeróbios (PEREIRA *et al*., 2004).

Hwu *et al.* (1998), ao estudar alguns parâmetros que influenciavam o desempenho de um reator anaeróbio de leito granular expandido (EGSB) na digestão de AGCL, verificou que ao se adotar um tempo de retenção hidráulica de 6 h, o reator entrou em colapso devido a flotação de grânulos de lodo misturados a material esbranquiçado semelhante a gordura, antes de apresentar sinais de toxicidade (queda na produção de metano).

A variação da DQO solúvel afluente e efluente nos reatores Controle e Teste pode ser visualizada nas Figuras 4.28 e 4.29.

Ao se comparar os resultados de DQO solúvel afluente dos reatores, nota-se que os valores encontrados para o reator Teste são 12% e 6% maiores no 1º e 2º regimes, respectivamente. Isto pode ser explicado pela aplicação de biossurfatante e *pool* enzimático no pré-tratamento do efluente de abate de aves. Em relação à DQO solúvel efluente, os valores obtidos em ambos os reatores são bem próximos, embora o reator Controle apresente um aumento de 29% no 2º regime (Tabela 4.28).

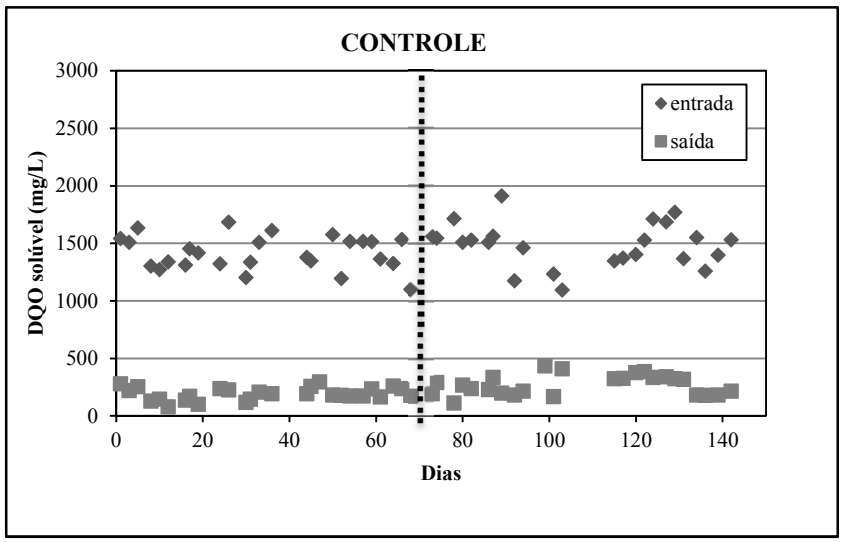


Figura 4.28: Variação da DQO solúvel de entrada e saída do reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

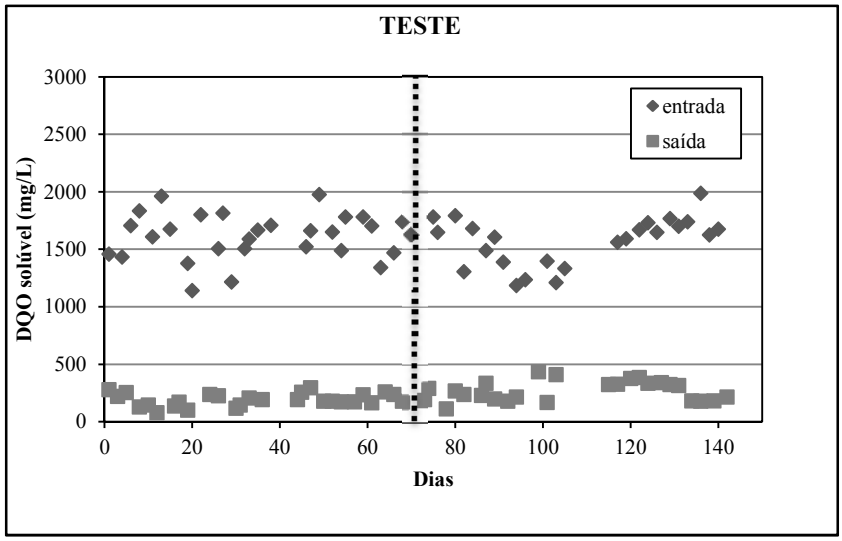


Figura 4.29: Variação da DQO solúvel de entrada e saída do reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

As eficiências de remoção de DQO total e solúvel para os reatores Controle e Teste são apresentadas nas Figuras 4.30 e 4.31.

As eficiências médias de remoção de DQO total e solúvel indicam que o reator Teste manteve-se estável, mesmo com o aumento da carga orgânica do 1º para o 2º regime, apresentando valores estatisticamente iguais para a remoção de DQO total e solúvel nos dois regimes (Tabela 4.28). Já o reator Controle apresentou pequena redução da DQO solúvel e uma queda de 19% na remoção de DQO total de um regime para o outro (Tabela 4.28),

podendo-se atribuir esta queda de eficiência ao material particulado presente no efluente sem pré-tratamento, principalmente gordura insolúvel.

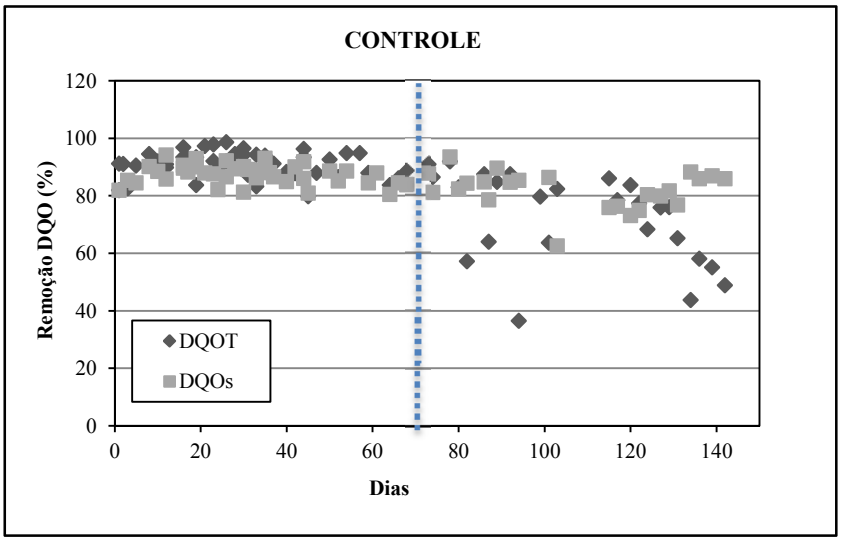


Figura 4.30: Eficiência de remoção de DQO total e solúvel para o reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

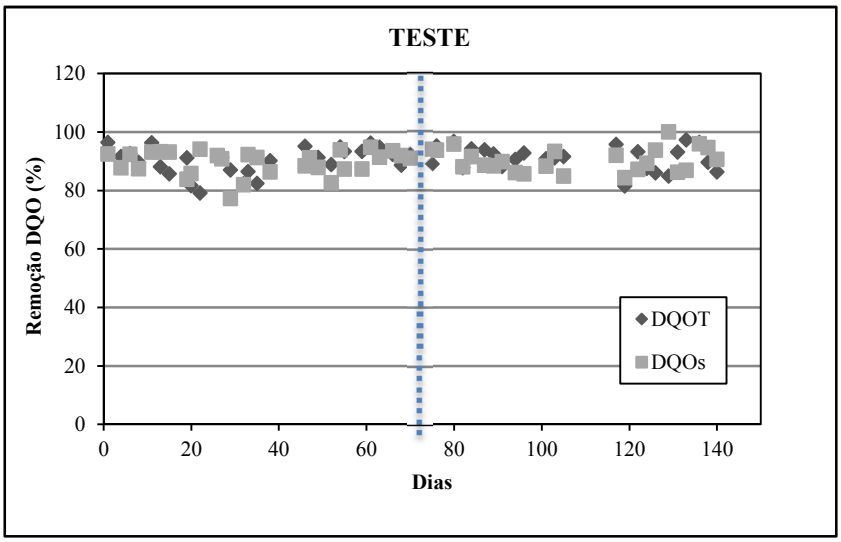


Figura 4.31: Eficiência de remoção de DQO total e solúvel para o reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

4.9.2.4 Óleos e graxas

As concentrações de O&G na entrada e saída dos reatores Controle e Teste são apresentadas nas Figuras 4.32 e 4.33. Ao se aumentar a carga orgânica volumétrica,

diminuindo o tempo de retenção hidráulica, o reator Controle reduziu sua eficiência de remoção de O&G em 45% (de 87% no 1º regime para 48% no segundo regime), fato que pode estar relacionado ao aumento da DQO total de saída apresentado pelo reator Controle. Para o reator Teste, ao contrário, as concentrações efluentes de O&G foram estatisticamente iguais no 1º e 2º regimes, mantendo eficiências de remoção próximas a 96%.

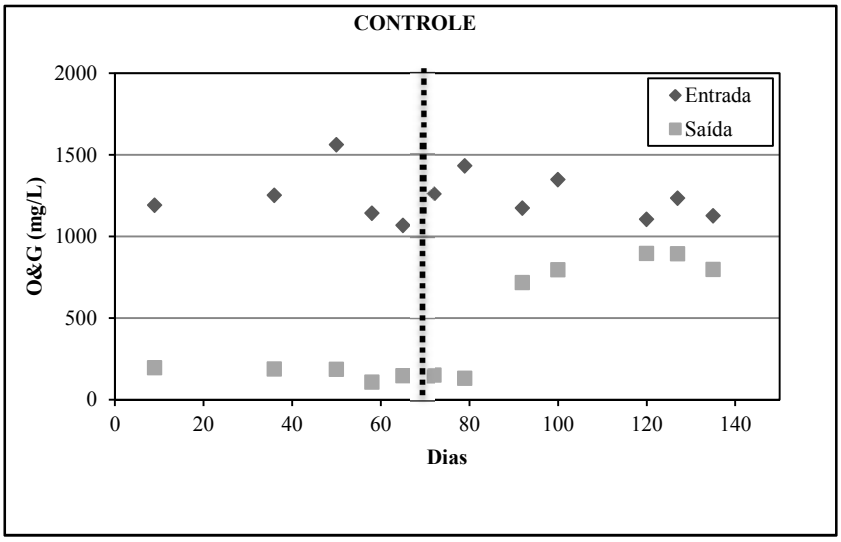


Figura 4.32: Concentração de Óleos & Graxas (O&G) na entrada e saída do reator Controle no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

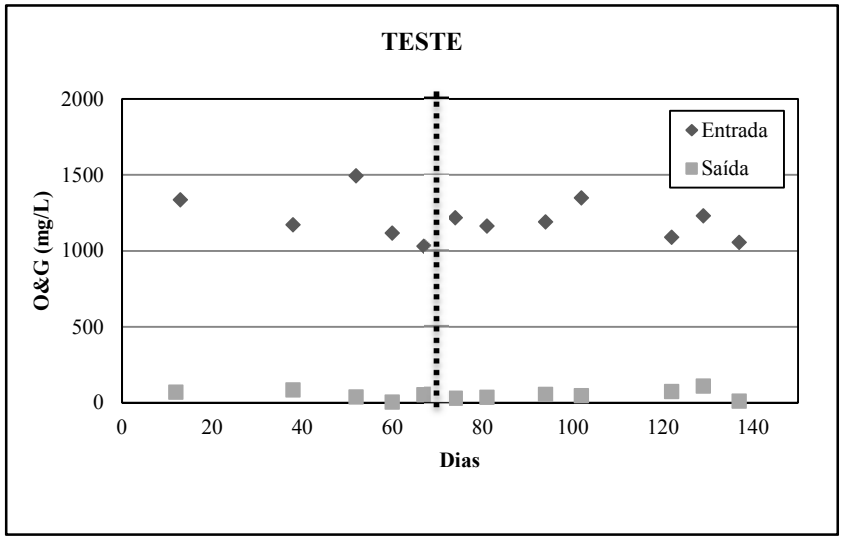


Figura 4.33: Concentração de Óleos & Graxas (O&G) na entrada e saída do reator Teste no 1º (pré-marcação) e 2º (pós-marcação) regimes.

Vale ressaltar que as concentrações de O&G no afluente dos reatores foram estatisticamente semelhantes, a fim de se evitar qualquer relação destas com as eficiências de remoção obtidas (Tabela 4.28).

Durante o período estudado, foram verificadas cinco obstruções na tubulação de saída de efluente, no topo do reator Controle. Estas obstruções foram provocadas pelo acúmulo de material flotado (escuma) no separador trifásico do reator. A cada obstrução, a tampa superior do reator era removida para retirada da escuma. Apesar do reator Teste não ter apresentado obstruções desta natureza, pois a presença de material sólido na sua superfície era bem menos frequente, o mesmo procedimento de limpeza foi promovido também neste reator. O material retirado foi analisado em termos de O&G e sólidos totais, sendo a concentração de O&G e o percentual de O&G na massa seca de resíduo retirado em cada procedimento de limpeza visualizados na Tabela 4.28 e Figura 4.34.

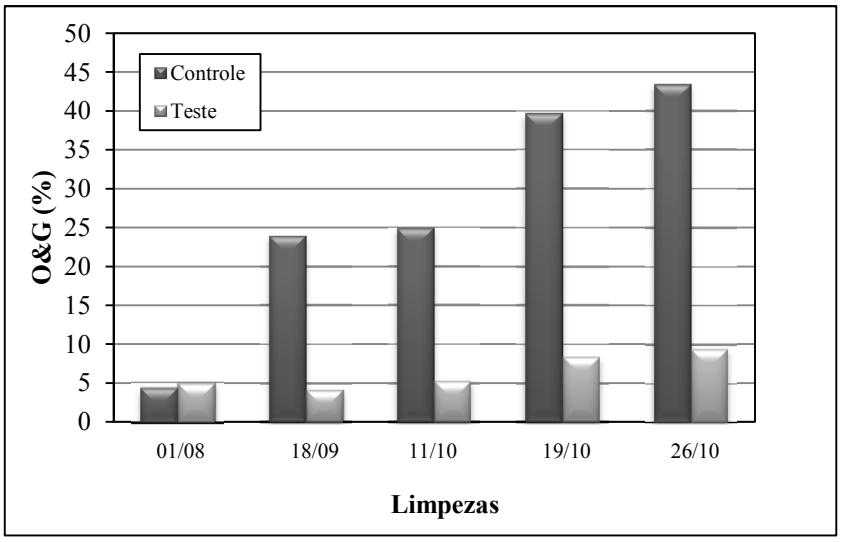


Figura 4.34: Acúmulo de O&G (%, base seca) na escuma dos reatores Controle e Teste.

Nota-se que, com exceção da primeira limpeza, o acúmulo de material gorduroso no reator Controle foi, no mínimo, 4,6 vezes maior que no reator Teste. Outros autores citam a flotação do lodo como um dos problemas operacionais mais frequentes no tratamento de efluentes com alto teor de gordura (JEGANATHAN, NAKHLA e BASSI, 2006; MIRANDA, HENRIQUE E MONTEGGIA, 2005; RINZEMA, ALPHENAAR e LETTINGA, 1993).

4.9.2.5 Produção de biogás

No 1º regime a produção média de biogás foi de 436,3 mL/dia (CNTP). No 2º regime, a produção aumentou para 709,5 mL/dia (CNTP) até o 95º dia de operação e, após este dia, reduziu para 143,9 mL/dia (CNTP) (Tabela 4.28).

Apesar de o reator Controle apresentar maior produção de metano no segundo regime, em função da maior carga orgânica aplicada, ocorreu um declínio na produção de biogás a partir do 95º dia, conforme pode ser visualizado na Figura 4.35, que ilustra a produção acumulada de biogás no decorrer da operação. Este declínio acentuado da produção de biogás pode ser associado a um acúmulo acentuado de escuma na superfície do reator, o que dificultou a liberação do biogás produzido; e ao acúmulo de gordura na biomassa, reduzindo as taxas de transferencia de massa (matéria orgânica – lodo anaeróbio – biogás).

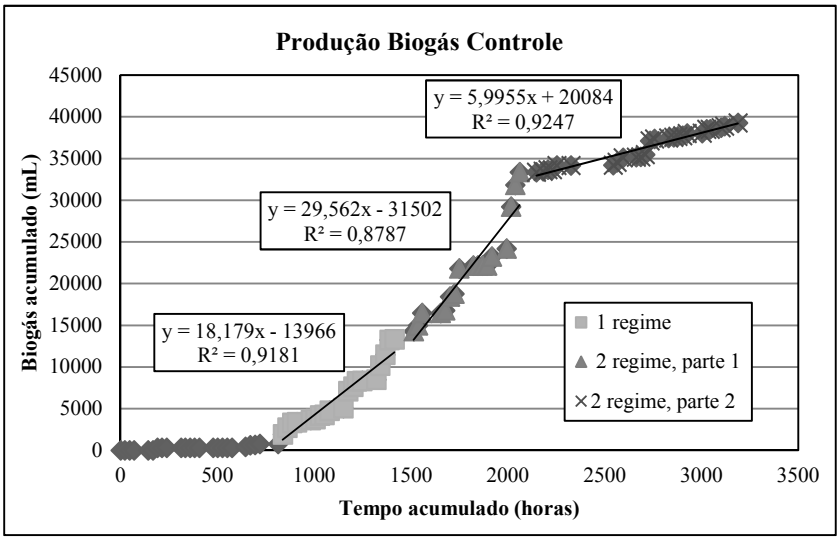


Figura 4.35: Acúmulo de biogás produzido no reator Controle ao longo das horas de operação (Volume de biogás corrigido para CTNP).

A composição do biogás produzido durante a digestão anaeróbia pode variar de acordo com as condições ambientais presentes no reator. Esta composição pode mudar rápida e drasticamente durante o período inicial de partida do sistema ou quando o processo de digestão é inibido (VALLADÃO, 2009). O biogás produzido no tratamento de esgotos domésticos apresenta teores de metano variando de 70 a 80% (CHERNICHARO, 2007). No entanto, no tratamento de efluentes industriais a relação metano/dióxido de carbono é alterada de acordo com a composição do efluente a ser degradado (VALLADÃO, 2009).

A produção acumulada de biogás no decorrer da operação do reator Teste pode ser visualizada na Figura 4.36. Pode-se verificar uma produção de biogás praticamente constante, de 598,5 e 662,2 mL/dia no 1º e 2º regimes, respectivamente, comprovando a estabilidade de produção de biogás frente a diferentes cargas orgânicas aplicadas.

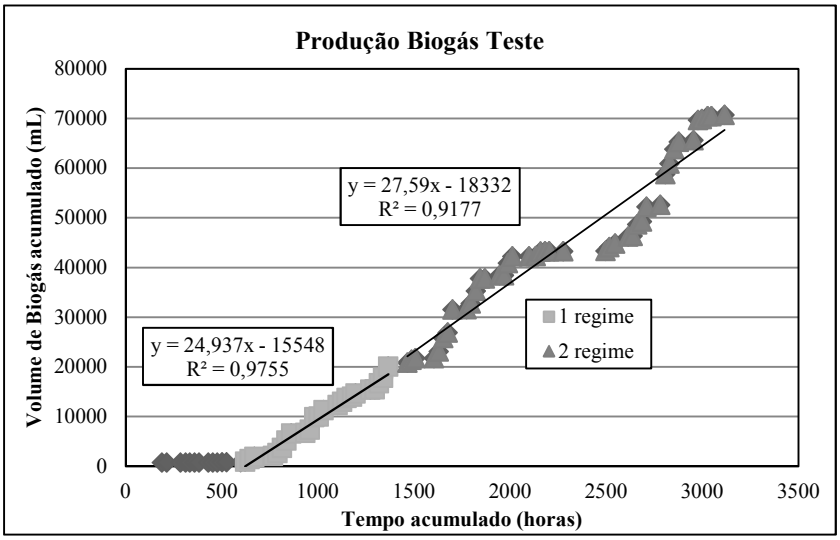


Figura 4.36: Acúmulo de biogás produzido no reator Teste ao longo das horas de operação (Volume de biogás corrigido para CTNP)

A produção específica de metano (PEM) média foi calculada para cada regime nos dois reatores através de gráficos de taxa de produção de biogás acumulado versus DQO removida acumulada, como apresentado nas Figuras 4.37 e 4.38. Considerando os percentuais médios de metano no biogás, podem-se calcular os valores médios obtidos apresentados na Tabela 4.28. Tanto o reator Controle como o Teste apresentaram valores muito aquém dos limites teóricos relatados (350 mL CH_4/g DQO nas CNTP) (CHERNICHARO, 2007). Porém, mesmo discretos, os valores obtidos no reator Teste são maiores que os obtidos no reator Controle no 1º e 2º regimes.

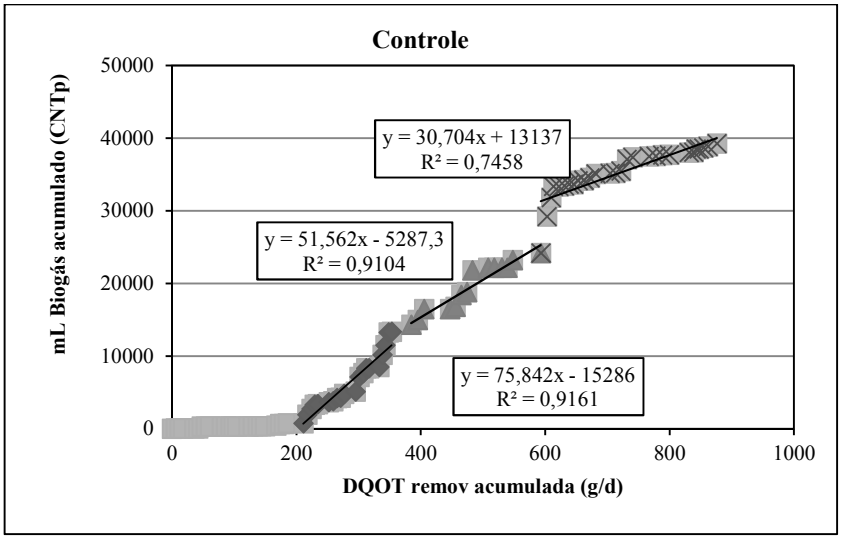


Figura 4.37: Relação entre volume de biogás acumulado (CNTP) versus DQO total removida acumulada para o reator Controle.

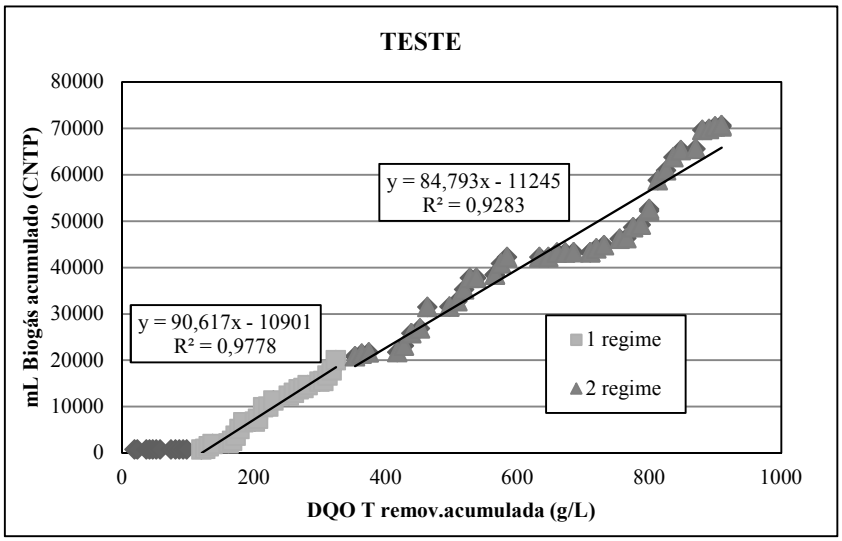


Figura 4.38: Relação entre volume de biogás acumulado (CNTP) versus DQO total removida acumulada para o reator Teste.

Comparando os valores obtidos nos testes de biodegradabilidade anaeróbia da quinta batelada, com os obtidos no reator UASB, observa-se menores valores para a PEM. Uma hipótese seria que nos testes em batelada, a matéria orgânica de início adsorvida é, ao longo dos 13 dias da batelada, de fato metabolizada e convertida em metano, enquanto que no TRH dos reatores UASB (12 a 20 h) a DQO removida por adsorção não tem tempo suficiente para a completa metabolização, resultando em altos valores de DQO removida e baixa produção de metano, levando a uma PEM mais baixa. Outra explicação possível seria, apesar de todo o cuidado, uma perda considerável de biogás na saída de efluente dos reatores UASB.

4.9.2.6 Sólidos suspensos voláteis

Ao término de cada regime a biomassa dos reatores foi avaliada, sendo quantificada como sólidos suspensos voláteis (SSV), conforme ilustrado na Tabela 4.29, segundo procedimento descrito em 3.2.7.

Tabela 4.29: Sólidos Suspensos Voláteis dos reatores Controle e Teste após cada regime estudado

	Regime	Volume Lodo (m^3) no reator	Sólidos Suspensos Voláteis (kg/m^3)	
			Amostra	Cr (conc. nos reatores)
Inóculo	-	360×10^{-6}	44,0	14,7
Controle	1º	765×10^{-6}	28,5	20,2
	2º	227×10^{-6}	15,0	3,2
Teste	1º	765×10^{-6}	33,5	23,7
	2º	765×10^{-6}	30,2	21,4

A concentração de lodo inicial, dentro dos reatores, foi de 14,7 g SSV/L. Notou-se que no 1º regime, os reatores tiveram um aumento da concentração de biomassa, sendo de 37,4% para o Controle e 61,2 % para o Teste. De acordo com a literatura, os reatores UASB devem apresentar uma concentração de sólidos após a inoculação na faixa de 20-40 g SSV/L (STRONACH, RUDD e LESTER, 1986, *apud* VALLADÃO, 2009). O teor de sólidos após a inoculação dos reatores ficou abaixo do valor recomendado na literatura; entretanto, ambos, após o 1º regime, alcançaram valor compatível com a literatura. No 2º regime, tanto o reator Controle como o Teste, apresentaram uma queda na concentração de biomassa. Esta queda foi expressiva no reator Controle, devido à flotação do lodo e consequente perda de biomassa junto ao efluente e formação de escuma, comprovado pela ausência de lodo no amostrador A3, resultando num menor volume da seção ocupada pela biomassa. Já para o reator Teste esta perda de biomassa do 1º para o 2º regime foi pequena, permanecendo dentro da faixa de concentração ideal recomendada na literatura.

4.9.2.7 Óleos e graxas na biomassa

A quantidade de O&G no lodo anaeróbio também foi avaliada após cada regime de operação, conforme pode ser visualizado na Figura 4.39.

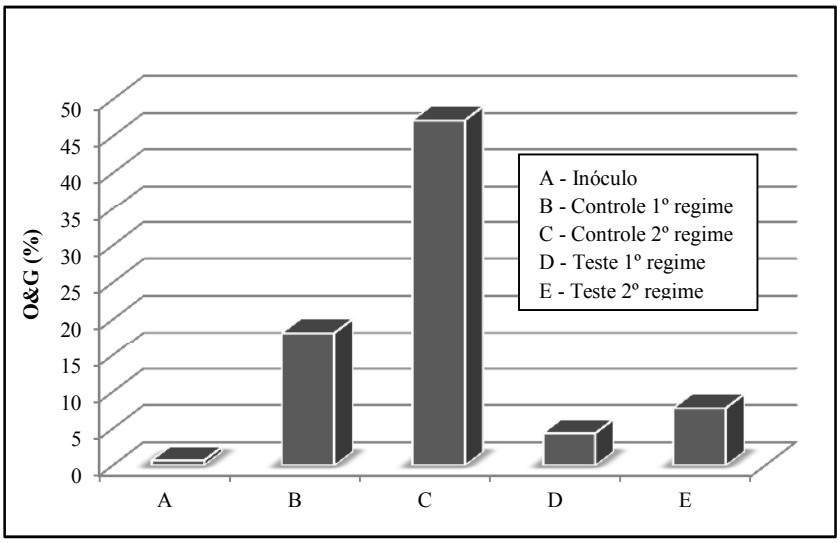


Figura 4.39: Acúmulo de O&G (% em base seca) no lodo anaeróbio dos reatores Controle e Teste, no 1º e 2º regimes.

Como pode ser visto, houve aumento de material gorduroso aderido aos grânulos de lodo anaeróbio nos dois reatores. No entanto, no reator alimentado com efluente pré-tratado este acúmulo foi bem menor, ficando em 4,4% no primeiro regime e 7,8% no segundo regime. Já para o reator Controle a porcentagem média de O&G acumulada no lodo foi de 18,2 % e 47,2 % no 1º e 2º regimes, respectivamente.

Valladão (2009) estudou o comportamento de reatores UASB no tratamento de efluente de abate de aves e observou nas regiões em que a biomassa é mais concentrada (manta e leito de lodo) uma concentração média de gordura acumulada em relação à concentração de biomassa (SVS) de 105,1±24,7 mg/g no 1º regime estudado, aumentando para 456,8 ±18,4 mg/g no 2º regime para o reator Controle, configurando um aumento de mais de 4 vezes. Já no reator que recebeu o efluente com pré-tratamento enzimático este valor no 1º regime foi de 58,8 ±4,9 mg/g e aumentou para 138,5 ±40,7 mg/g no 2º regime, configurando um aumento de pouco mais de 2 vezes, resultados similares aos encontrados neste trabalho.

Os resultados obtidos neste trabalho relatam a importância e a viabilidade técnica do uso de *pool* enzimático e biossurfatante no pré-tratamento de efluente de abate de aves com elevado teor de gordura. O reator Teste mostrou-se mais estável, mesmo com o aumento da carga orgânica volumétrica. As diferenças entre os reatores são nítidas, em termos de volume

de metano produzido, bem como de acúmulo de material gorduroso, tanto aderido ao lodo anaeróbio, bem como na escuma formada no topo do reator.

4.9.2.8 Análise da diversidade microbiana

A diversidade microbiana foi monitorada por técnicas de biologia molecular (PCR-DGGE) de amostras de lodo dos biorreatores nos regimes estudados. Os dois biorreatores receberam inóculos de lodo anaeróbio de mesma origem, possuindo, portanto, a mesma composição microbiana no início da operação.

A Figura 4.40 apresenta o gel do DGGE para o Domínio Bacteria nos biorreatores em cada regime estudado. O gel de DGGE para o Domínio Bacteria mostrou que a diversidade bacteriana do lodo anaeróbio dos biorreatores, ao longo de sua operação, foi pouco modificada, pois uma similaridade de 88% foi obtida entre o inóculo e as demais amostras. A maioria das bandas aparecem em todas as amostras, o que pode ser um indicativo da presença de espécies bem adaptadas, que se mantiveram mesmo com a mudança dos regimes. Pode-se observar também o surgimento de algumas bandas específicas para cada amostra, tanto no reator Controle com no Teste, assim como o desaparecimento de algumas que eram visualizadas apenas no inóculo (Figura 4.40), as quais representavam possíveis espécies suceptíveis aos constituintes do efluente e ao acúmulo de gordura e/ou AGCL.

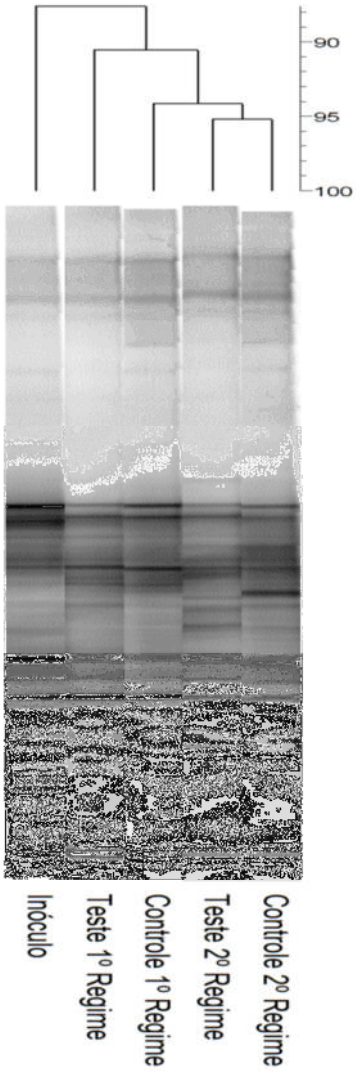


Figura 4.40: Gel de DGGE de amostras de lodo dos biorreatores UASB nos dois regimes estudados, bem como do inóculo, com concentrações de agentes desnaturantes variando de 40 a 70%, utilizando primers para o Domínio Bacteria.

Sousa *et al*. (2007) estudaram a diversidade microbiana presente no lodo anaeróbio de dois reatores de leito expandido (EGSB), operando de forma contínua, sendo um alimentado com ácido palmítico e o outro com ácido oleico. Os biorreatores foram inoculados com lodo anaeróbio proveniente de um digestor de lodo, o qual foi adaptado com alimentação em batelada de leite desnatado (50%) contendo os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL): palmítico, mirístico, esteárico e oleico. A diversidade microbiana foi monitorada através de eletroforese em gel (DGGE), obtida pela amplificação dos fragmentos de genes de rRNA 16S, utilizando a técnica do PCR. Ao analisar as bandas visualizadas nos géis, os autores observaram mudanças na diversidade microbiana durante a degradação e acúmulo de AGCL,

sendo estas mudanças mais expressivas na fase de adaptação do lodo (inóculo) em batelada. Ao analisar os dendogramas dos lodos dos reatores EGSB, verificou-se a presença de bandas distintas entre os géis, fato que os autores relacionam à diferença da alimentação, já que os biorreatores recebiam diferentes substratos.

4.10 ANÁLISE ECONÔMICA

A digestão anaeróbia tem sido extensivamente aplicada com sucesso no tratamento de efluentes industriais na ultimas décadas. A busca por energias alternativas fez com que estes processos ocupassem ainda mais importância, uma vez que combina a remoção de poluentes orgânicos com a geração de energia (biogás). O rendimento energético do processo depende da matéria orgânica presente na água residuária e pode ser especialmente elevado ao se tratar de lipídeos e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). AGCL são frequentemente encontrados em efluentes industriais, como sendo o principal produto da hidrólise (SOUSA *et al.,* 2007). Porém, sua remoção a partir de pré-tratamento por processos físico-químicos, antes do tratamento anaeróbio é uma prática comum, que se reflete na perda de seu potencial energético elevado com consequente déficit nos lucros. Portanto, a análise de viabilidade econômica deve ser capaz de responder se o pré-tratamento com a utilização de *pool* enzimático e biossurfatante é uma alternativa interessante para a indústria de abate de aves frente às tecnologias usuais de tratamento de efluente.

O *software SuperPro Designer*, versão 8.0 licença completa, foi utilizado para as construções dos fluxogramas, balanços de massa e energia dos processos biotecnológicos de pré-tratamento de efluentes da indústria de abate de aves, obtendo como produto final o efluente pré-tratado. Os dados do processo (vazão de efluente, bem como sua caracterização) foram inseridos no software para simulação dos projetos de pré-tratamento de efluentes e dimensionamento dos equipamentos necessários.

Para a simulação o estudo foi dividido em dois cenários. O primeiro relacionado ao pré-tratamento usual de efluentes de abatedouros de aves, semelhante ao adotado pela indústria que cedia o efluente utilizado neste trabalho, o qual pode ser visualizado na Figura 4.41.

A etapa de pré-tratamento usual foi dividida em quatro operações. Como a vazão do efluente sofre alterações diárias, existe a necessidade da instalação de um tanque de equalização, provido de agitação para evitar o acúmulo de sólidos no fundo do tanque. A

corrente de saída do equalizador é misturada com soluções de coagulante (cloreto férrico) e floculante aniônico, que segue para o flotador de ar dissolvido (FAD), onde ocorre a etapa de flotação quimicamente auxiliada, na qual o material insolúvel (gordura, sólidos, entre outros) é separado do efluente através de processo físico (diferença de densidade). O "lodo" do flotador (gordura, coagulante, sólidos finos) é direcionado para o equipamento tri-decanter, onde grande parte de sua umidade é retirada. O material desidratado é então separado, ensacado em sacos plásticos de 20 litros e destinado ao aterro sanitário. As correntes de efluente, resultantes do flotador e do tri-decanter, são misturadas em um tanque de mistura, onde são armazenadas e destinadas ao tratamento secundário.

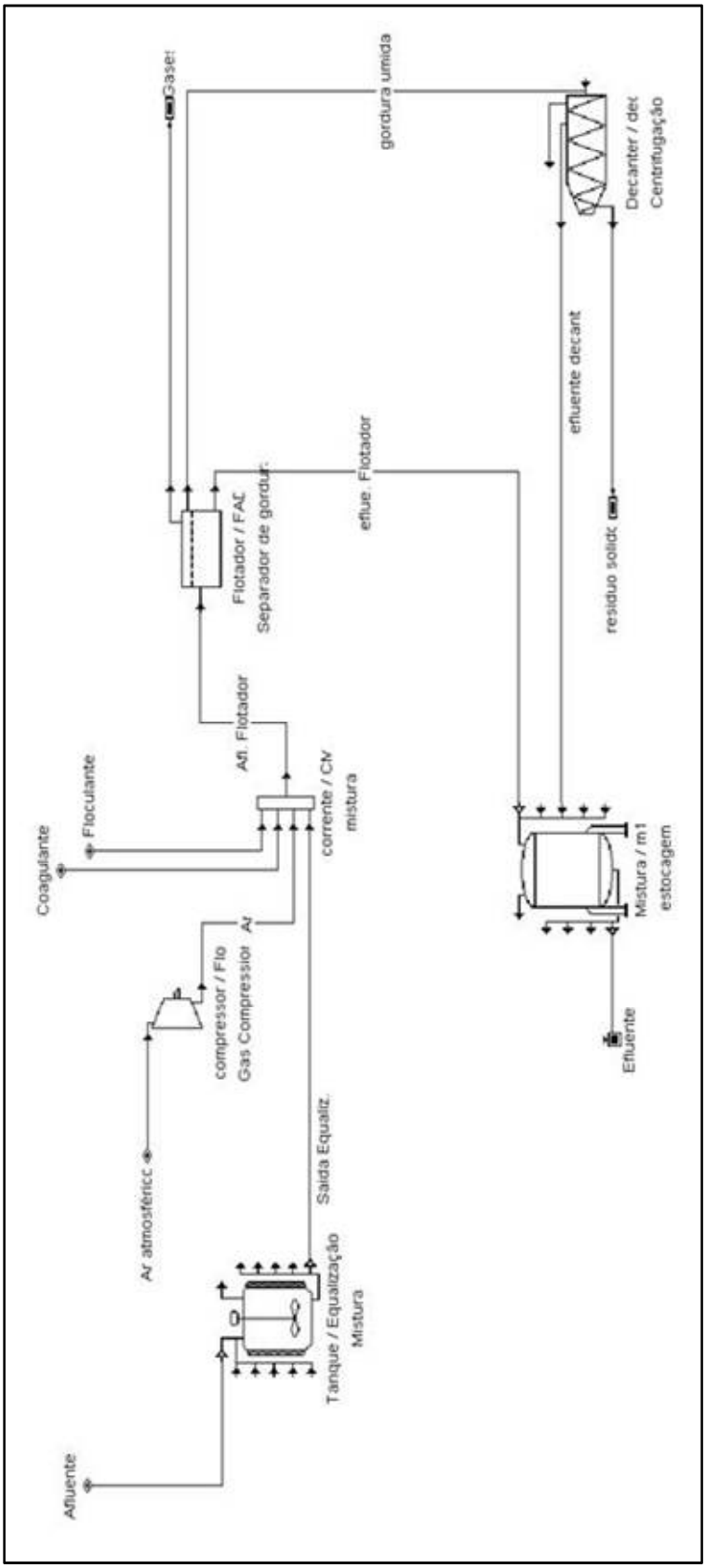


Figura 4.41: Fluxograma para o pré-tratamento de efluente de abate de aves utilizando-se a tecnologia usual.

Em outro cenário foi montada a planta necessária para execução da tecnologia alternativa proposta (adição de *pool* enzimático e biossurfatante), na condição ótima encontrada, de acordo com a Figura 4.42.

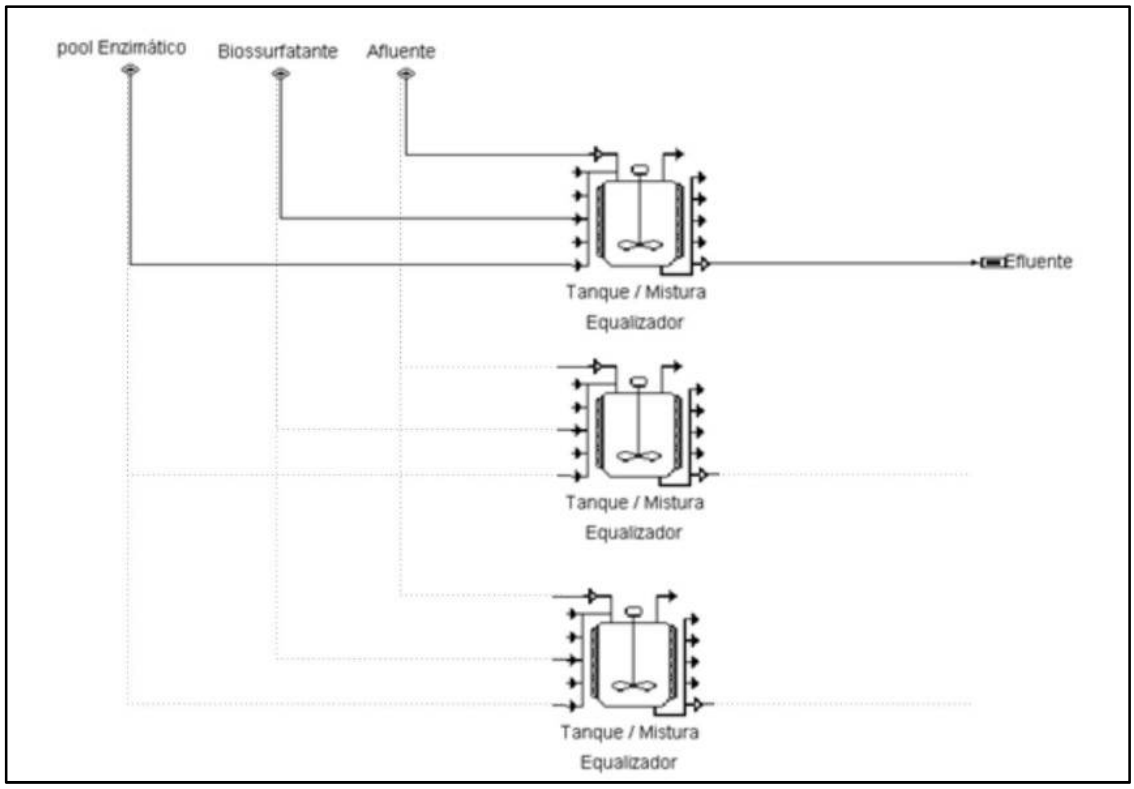


Figura 4.42: Fluxograma para o pré-tratamento de efluente de abate de aves utilizando tecnologia alternativa.

Serão necessários três tanques de equalização, de mesmo volume, operando sob regime de batelada. Cada batelada terá a duração total de 12 horas, sendo as quatro primeiras destinadas ao enchimento do tanque com o efluente industrial, *pool* enzimático e biossurfatante. Após este período, a agitação será ligada, permanecendo em batelada durante quatro horas, tempo ideal para que ocorra a pré-hidrolise devido a ação das enzimas e do biossurfatante. Após 4 horas, o tanque será desocupado, também durante quatro horas, sendo todo o processo repetido duas vezes ao dia, ou seja, os tanques serão operados 24 horas por dia, sincronizados de modo que em cada equalizador ocorra uma etapa distinta dos demais, possibilitando assim a operação contínua da estação de tratamento.

Foram considerados 312 dias trabalhados ao ano, com a estação de tratamento operando 24 horas por dia, e vazão média diária de 750 m^3 de efluente ou 31,25 litros por hora.

Por se tratar de um estudo comparativo entre os dois cenários, fatores como custo de partida das plantas, bem como capital de giro não foram estudados.

O custo total do pré-tratamento, em ambos os cenários, foi calculado pela soma do custo de implantação (investimentos fixos) e da concretização das operações (custos operacionais).

4.10.1 **Custo de implantação**

O custo de implantação foi composto pelo custo de aquisição e instalação dos equipamentos, bem como pelo custo de tubulações, isolamentos, edificações e instalações auxiliares. O preço da maioria dos equipamentos foi conseguido através de orçamentos de empresas especializadas. Apenas o custo do equipamento "tanque de equalização" foi calculado através das normas da ABNT (NBR 6118 e NBR 7229) e procedimentos descritos em Peters, Timmerhaus e West (2003), utilizando concreto armado como material de construção. O custo com instalações, tubulações, isolamentos, edificações e instalações auxiliares foram simulados pelo software tendo com referência o preço e as características dos equipamentos, os quais variam de acordo com os cenários.

Conforme observado nos croquis (Figuras 4.41 e 4.42), as plantas de tratamento possuem operações diferenciadas, refletindo em equipamentos diferentes. Para o caso do cenário usual, que simula o pré-tratamento mais adotado para efluentes com alto teor de gordura, conforme é o caso da indústria de abate de aves que cedeu o efluente para este estudo, é necessária a instalação de quatro equipamentos: tanque de equalização, flotador de ar dissolvido, centrífuga tri-decanter e tanque de mistura. Já para o cenário alternativo, será necessária a instalação de três tanques de equalização operando em regime de batelada. O custo de implantação varia de acordo com o volume de efluente produzido, uma vez que o tamanho e a capacidade dos equipamentos dependem do volume a ser tratado. Para a simulação das duas plantas foi adotada uma vazão média de 750 m^3/dia ou 31.250 L/h.

Na Tabela 4.30 estão descritos os equipamentos e seus respectivos custos de aquisição (em janeiro de 2013), para a implantação das plantas de pré-tratamento usual e alternativa. Observa-se que o custo total para aquisição dos equipamentos necessários para implantação da planta na qual se utiliza a tecnologia usual é três vezes maior que o da planta alternativa. O custo unitário para o tanque de equalização difere entre as plantas em função do modo de operação. Para a planta usual, este equipamento opera de modo contínuo, já para a planta

alternativa, os equalizadores operariam em batelada, resultando em aumento de seu volume de trabalho e do preço unitário.

Tabela 4.30: Quantidade e custo dos equipamentos necessários para implantação das plantas de tecnologia usual e alternativa para o pré-tratamento de efluente de abate de aves

	Quantidade	Volume/Capacidade	Material	Preço Unitário (R$)
		Tecnologia Usual		
Tanque de equalização	01	30 m^3	Concreto	12.685,00
Flotador de ar dissolvido	01	30 – 35 m^3/h	Fibra de vidro	149.000,00
Centrífuga Tri-decanter	01	10 – 15 m^3/h	Aço inox	175.000,00
Tanque de mistura	01	30 m^3	Fibra de vidro	7500,00
Total				344.185,00
		Tecnologia Alternativa		
Tanque de equalização	03	158 m^3	Concreto	36.868,00
Total				110.604,00

Ao se analisar os dados da Tabela 4.30, fica evidenciado que praticamente todo o custo de aquisição de equipamentos está relacionado à retirada do material insolúvel presente neste tipo de efluente, sobretudo sob a forma de gorduras.

O material gorduroso pode ocasionar problemas operacionais nos sistemas de tratamento biológico se não removido ou pré-tratado adequadamente, conforme relatado no decorrer deste trabalho. Porém, empregando-se uma tecnologia apropriada para solubilização e hidrólise, os lipídeos podem ser efetivamente convertidos em metano pela comunidade microbiana (ALVES *et al.*, 2009), tornando-se um biocombustível de notável valor econômico, que é em grande parte desperdiçado pela retirada de gordura nos métodos usuais de pré-tratamento.

Todo o capital requerido para instalação dos equipamentos, como tubulações, pavimentação, instrumentação, edificações, instalações auxiliares, entre outros, é calculado pelo *software* tendo como referência as especificações dos equipamentos. O custo fixo (somatório do custo de aquisição e instalação dos equipamentos) estimado para a planta usual foi de R$ 2.670.000,00 e para a planta alternativa foi de R$ 1.326.000,00, uma economia de aproximadamente 50%, ao se optar pela tecnologia alternativa.

4.10.2 **Custos operacionais**

Os custos operacionais referem-se aos gastos proporcionais à produção e englobam custos com reagentes, utilidades, disposição de resíduos e manutenção das plantas, que variam de acordo com o volume de efluente tratado, sendo, portanto, considerados como custos variáveis.

Para os cálculos do consumo de insumos para a planta usual foram consideradas as proporções relatadas na literatura (MAGNAN, 2010). Para a planta alternativa foram consideradas as proporções dos experimentos de escala de bancada que refletiram em maiores rendimentos de metano e menor acúmulo de gordura na biomassa anaeróbia.

O volume consumido de utilidades foi simulado pelo *software* de acordo com as especificações dos equipamentos e com o volume de efluente tratado. Os preços utilizados foram obtidos no trabalho de Encarnação (2008), corrigidos pelo IGP-M (Índice Geral de Preços de Mercado) divulgado pela Fundação Getúlio Vargas para janeiro de 2013. O índice de correção foi de 1,3659616. As utilidades necessárias para a planta usual foram energia elétrica e vapor de 15 kgf/cm^2, e para a planta alternativa somente energia elétrica. O valor adotado por kWh foi de R$ 0,34 (preço médio nacional para o ano de 2012) e para o vapor foi de R$ 119,54 por tonelada (ENCARNAÇÃO, 2008).

O preço dos reagentes foi estipulado de acordo com os preços de mercado, obtidos por orçamentos e/ou pesquisa bibliográfica. O preço adotado para o coagulante químico cloreto férrico foi de R$ 0,82 por quilo, com densidade de 1,42 kg/L e para o floculante aniônico A-130 foi de R$ 8,73 por quilo, valores do trabalho de Magnan (2010) atualizados pelo IGP-M.

O biossurfatante escolhido foi o JBR 215 fornecido pela JENEIL, contendo 15% de ramnolipídeo, custando (corrigido em reais) R$ 108,00 por litro (SANTOS, 2004). O preço do *pool* enzimático rico em lipase adotado foi obtido no trabalho de Castilho *et al*. (2000), corrigido para o ano de 2013, ficando igual a R$ 83,10 o litro.

O custo com a disposição de resíduo, classificado como resíduo classe II – A, foi calculado de acordo com o peso destinado ao aterro sanitário, com umidade variando de 40% a 70%. O preço por tonelada de resíduo (R$ 150,00) foi adotado de acordo com estimativa fornecida pela empresa de tecnologia e planejamento ambiental responsável pela destinação final dos resíduos sólidos da indústria de abate de aves (HAZTEC, 2013).

O custo com o pagamento de pessoal, o qual não varia com o volume de efluente tratado, são considerados custos fixos. As despesas com pessoal são representadas pelos

salários e encargos das equipes de trabalho. Os cargos requeridos para a operação contínua da planta de tratamento foram considerados divididos em 4 turnos de 8h diárias, com uma folga por grupo por dia. O custo anual considera 13°salário e encargos adicionais de 106% do salário (ENCARNAÇÃO, 2008). Para o cálculo do custo por hora referente ao pagamento de pessoal foi utilizada a Equação 4.1, adotando salário básico mensal de R$ 678,00 (salário mínimo nacional em janeiro de 2013).

$$CP_h = [SB \times 13 \times e]/N_h \quad (4.1)$$

Onde:

CP_h = custo com salários e encargos dos operadores por hora (R$/h)

SB = salário básico mensal de cada operário (R$/mês)

13 = 12 meses do ano mais o 13˚salário (mês/ano)

e = percentual relativo aos encargos trabalhistas

N_h = número de horas trabalhadas por ano.

Vale ressaltar que, por não atribuir preço para o produto final, não foi possível quantificar a receita (lucro menos despesas) e o tempo de retorno para as simulações sugeridas.

O custo operacional para as plantas de pré-tratamento varia em função do volume de efluente gerado. Para a análise de custo foi considerada a vazão média diária de efluente produzido na indústria de abate de aves que cedia o material (750 m^3/d). Na Tabela 4.31 estão apresentados os custos operacionais para os dois cenários: usual e alternativo.

Tabela 4.31: Custos operacionais anuais (em reais) para operação das plantas de pré-tratamento usual e alternativa

Item	Usual	Alternativa
Matéria-prima	71.000,00	6.057.000,00
Mão de obra	117.000,00	39.000,00
Investimentos e relacionados	507.000,00	263.000,00
Análises físico-químicas	18.000,00	6.000,00
Tratamento/disposição de resíduos	543.000,00	-
Utilidades	587.000,00	1.000,00
Total	1.841.000,00	6.366.000,00

Observando as várias categorias, os custos relacionados à disposição de resíduo sólido (lodo do flotador desidratado), utilidades (vapor e energia elétrica) e investimentos e relacionados (depreciação dos equipamentos e manutenção) para a tecnologia atual, são os componentes que mais encarecem o pré-tratamento deste tipo de efluente. Vale ressaltar que o custo com a disposição dos resíduos, aqui apresentado, refere-se somente ao custo de disposição em aterro sanitário. Este custo estaria subestimado, uma vez que não contabiliza o custo com translado do ponto de geração (indústria) ao destino final (aterro sanitário). Outro aspecto a ser considerado é que o resíduo sólido é praticamente composto por material gorduroso, separado do efluente por processo físico-químico, o qual poderia ser convertido em metano, uma fonte de bioenergia.

Já para o tratamento alternativo, o custo com disposição de resíduo sólido é nulo, uma vez que o material gorduroso é solubilizado pela adição do biossurfatante, podendo assim, ser hidrolisado pela ação do *pool* enzimático rico em lipases. Isto reflete, neste caso, em um maior custo de aquisição de matéria prima, sendo esta responsável por 95,2% do custo operacional desta planta. Este custo pode ser reduzido com a obtenção de enzimas e biossurfatante produzidos a partir de rejeitos industriais, lembrando que, para efeito de simulação, os preços utilizados neste estudo são de enzima e biossurfatante comerciais, conhecidos por serem bioprodutos de elevado valor. A utilização desta tecnologia alternativa ainda possibilitaria um aumento na produção de biogás e em maior tempo de manutenção do sistema de tratamento secundário, unidade que recebe o efluente pré-tratado, uma vez que todo o material gorduroso seria pré-hidrolizado, o que facilitaria a ação dos micro-organismos anaeróbios, diminuindo assim o acúmulo deste tipo de material, responsável por sérios problemas operacionais, inclusive o colapso do biorreator, como explanado anteriormente.

O custo com pessoal (mão de obra) é aproximadamente três vezes maior na planta usual, devido à presença de um maior número de etapas e equipamentos na estação de tratamento, como pode ser observado nas Figuras 4.41 e 4.42 (croquis), o que requer maior número de funcionários.

O gasto anual com investimentos e relacionados (depreciação, manutenção, reparos, seguros, entre outros) também é maior na planta usual devido à maior quantidade de equipamentos necessários ao pré-tratamento do efluente da indústria de abate de frangos, sendo esta também a justificativa pelo custo maior com análises físico-químicas nesta opção de tecnologia, uma vez que há necessidade de um maior número de pontos de amostragem para monitoramento das unidades.

Outro ponto a ser ressaltado são as utilidades, englobando energia elétrica, utilização de vapor ou água de resfriamento. Neste caso, para a planta alternativa este custo está relacionado apenas com o consumo energético requerido pelas moto-bombas responsáveis pelo enchimento e esvaziamento dos tanques de equalização, bem como seus agitadores. Já para a planta usual, além do gasto energético com moto-bombas, agitadores e flotador, existe ainda um custo relacionado ao vapor utilizado para o aquecimento do tri-decanter, equipamento utilizado para retirar o excesso de umidade da gordura separada no flotador, refletindo em um consumo de utilidades muito maior quando comparado ao requerido pela tecnologia alternativa. Na Figura 4.43 são apresentadas as distribuições dos custos operacionais nas plantas: usual (A) e alternativa (B).

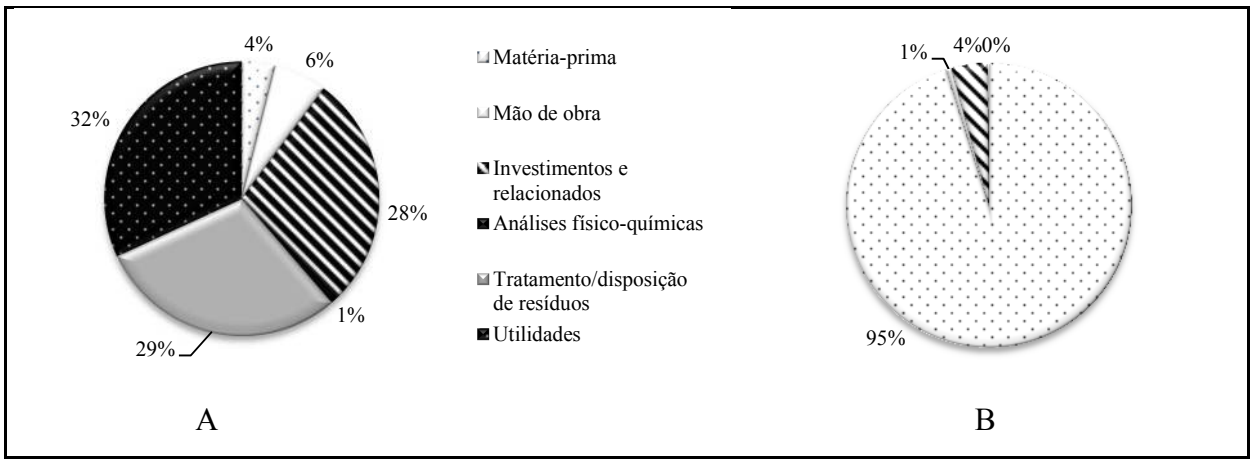


Figura 4.43: Distribuição do custo operacional para as plantas A – usual e B- alternativa

Conforme já discutido, o custo relacionado a tratamento/disposição do resíduo sólido, utilidades e investimentos e relacionados, são os fatores que mais têm impacto no custo total operacional para a planta de tecnologia usual, sendo 29 %, 32 %. e 28 %, respectivamente. Já para a planta de tecnologia alternativa, o custo com a aquisição de matéria prima (enzimas e biossurfatante) é o fator que mais tem influência no custo operacional final.

Em resumo, a avaliação econômica para ambos os cenários, simulada pelo *software* Super pro é apresentada na Tabela 4.32.

Tabela 4.32: Resumo da avaliação econômica para os cenários: planta usual e planta alternativa.

	Planta Usual	Planta Alternativa
Volume Efluente pré-tratado	230.451,66 m^3 /ano	234.062,55 m^3/ano
Custo de Implantação	R$ 2.670.000,00	R$ 1.326.000,00
Custo operacional anual	R$ 1.841.000,00	R$ 6.366.000,00
Custo por litro de efluente tratado	R$ 0,01	R$ 0,03

De acordo com a análise econômica pode-se notar que a opção pela tecnologia alternativa resulta em um maior custo de pré-tratamento para o efluente de abate de aves. No entanto, esta análise restringiu-se somente ao tratamento do efluente em questão, sem a obtenção de lucro ou uma previsão de retorno, o qual poderia ser atribuído à maior geração de biocombustível proveniente do tratamento secundário anaeróbio e que, consequentemente, refletiria positivamente na planta de tratamento alternativo, uma vez que praticamente todo lipídeo insolúvel, que poderia ser convertido a metano, é retirado no pré-tratamento convencional.

Considerando os dados levantados no primeiro regime de operação do biorreator Controle: uma PEM média de 65 $mLCH_4/g\ DQO_{remov}$ a 25ºC e uma vazão de efluente de 750 m^3/d (com DQO total média de 5000 mg/L, reduzida para um valor final de 1500 mg/L) sendo introduzida em um biorreator de 625 m^3 (para um TRH de cerca de 20 h), pode-se estimar uma produção de metano de 171 m^3/d (a 25ºC) ou 112 kg/d. O valor da DQO total afluente foi estimado para uma remoção de 80% de SST no flotador e com base na relação SST/DQO de 0,25 obtida para o efluente. Já a DQO efluente foi obtida considerando-se uma eficiência de 70% no biorreator em escala industrial. A partir da reação:

$$CH_4\,(vap) + 2O_2 = CO_2 + 2\,H_2O(vap)$$

na qual: $\Delta H\ (298K) = -802$ kJ/mol

pode-se estimar a Energia (E) gerada a partir da combustão do metano pela equação:

$$E = \frac{\Delta H}{MM_{CH4}} . M_{CH4} \tag{4.2}$$

Tem-se, considerando 85% de eficiência na geração de energia pela máquina térmica da caldeira, uma geração de 4.771.900 kJ/d.

Considerando os dados levantados também no primeiro regime de operação do biorreator Teste: uma PEM média de 78 mL $CH_4/g\ DQO_{remov}$ a 25ºC e uma vazão de efluente

de 750 m^3/d (com DQO total média de 25028 mg/L, reduzida para um valor final de 7508 mg/L) sendo introduzida em um biorreator de 625 m^3 (para um TRH de cerca de 20 h), pode-se estimar uma produção de metano de 1025 m^3/d (a 25ºC) ou 671 kg/d. O valor da DQO total afluente seria o do efluente bruto, obtido na caracterização do efluente. Já a DQO efluente foi obtida considerando-se uma eficiência de 70% no biorreator em escala industrial. Haveria uma geração de 28.588.794 kJ/d, um potencial 6 vezes maior que o obtido com a tecnologia de pré-tratamento convencional.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

O monitoramento dos reatores UASB comprovou a viabilidade técnica do pré-tratamento utilizando 0,5 % (m/v) de *pool* enzimático produzido por *Penicillium brevicompactum* e biossurfatante do tipo ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 na metade da concentração micelar crítica por 4 h a 30ºC. O pré-tratamento nestas condições permitiu a obtenção de maiores eficiências de remoção de DQO e Óleos e Graxas e maior produção de metano, sem problemas operacionais frequentes.

A análise econômica, desconsiderando a produção de metano (bioenergia que pode ser aproveitada dentro da planta industrial) e empregando enzima e biossurfatante comerciais, bioprodutos de elevado preço, revelou que a utilização da tecnologia alternativa, no pré-tratamento de efluentes com alto teor de gordura, apresentou um custo superior ao da tecnologia usual, com a utilização de flotadores e produtos químicos.

O pré-tratamento de efluentes de abatedouros de aves utilizando a tecnologia alternativa, com a utilização e enzimas e biossurfatante pode resultar em uma produção de metano no tratamento secundário anaeróbio (epata subsequente ao pré-tratamento) seis vezes superior ao produzido com a utilização da tecnologia usual, o que refletiria em um menor custo operacional, substituindo a energia elétrica por bioenergia (biogás – metano).

5.2 SUGESTÕES

- Analisar a utilização de outros tipos de biossurfatante, como os lipopeptídeos, fosfolipídeos e surfatantes polimétricos, no pré-tratamento de efluentes, em substituição ao glicolipídeo (ramnolipídeo).
- Avaliar a aplicação do pré-tratamento com a utilização de *pool* enzimático e biossurfatante no efluente bruto gerado na indústria (com DQO média de 25028 mg/L) em biorreator de bancada, com e sem recirculação do efluente tratado.
- Avaliar a aplicação do pré-tratamento com a utilização de *pool* enzimático e biossurfatante em escala piloto.
- Monitorar e sequenciar a composição microbiana presente no lodo anaeróbio em cada regime estudado.
- Testar o pré-tratamento com outros efluentes industriais com alto teor de gordura.
- Avaliar o comportamento de diferentes tratamentos secundários, utilizando o efluente pré-tratado com *pool* enzimático e biossurfatante.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE; F.; DÉZIEL, E. **Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles**. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 86, nº 5, p. 1323-1336, 2010.

ABEF - Associação Brasileira dos Exportadores de Frango. **Relatório Anual 2012**, 2012, 113 p.

AITKEN, M.D.; MASSEY, I.J.; CHEN, T., HEILER, S. **Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants**. Water Research, vol.28, nº 9, p.1879-1889, 1994.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, 2.ed. San Diego/USA, 1999. 453 p.

ALEXANDRE, V. M. F.; VALENTE, A.; CAMAROTTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. **Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolyzed with a solid enzyme pool**. Renewable Energy, vol. 36, nº 12, p. 3439-3444, 2011.

AL-MUTAIRI, N.Z.; AL-SHARIFI, F.A.; AL-SHAMMARI, S.B. **Evaluation study of a slaughterhouse wastewater treatment plant including contact-assisted activated sludge and DAF.** Desalination, vol. 225, p.167–175, 2008.

ALVES, M. M., M. A.; PEREIRA, M. A.; SOUSA, D. Z; CAVALEIRO, A. J.; PICAVET, M.; SMIDT, H.; STAMS, A. J. M. **Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA) – Minireview**. Microbial Biotechnology, vol. 2, nº 5, p. 538-550, 2009.

ANDERSON, G.K.; YANG, G. **Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration**. Water Environment Research, vol. 64, p. 53, 1992.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. **Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion.** Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 37, nº 6, p. 808-812, 1992.

ANGELIDAKI, I.; SANDERS, W. **Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants.** Reviews in Environmental Science and Biotechnology, vol. 3, nº 2, p.117–129, 2004.

APHA (American Public Health Association), American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18. ed. New York, 2005.

ARAUJO, L. V.; ABREU, F.; LINS, U.; SANTA ANNA, L. M. M.; NITSCHKEC, M.; FREIRE, D. M. G. **Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion**. Food Research International, vol.44, p. 481–488, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6118:** Projeto de estruturas de concreto – Procedimento. Rio de Janeiro, 2003. 221 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7229:** Projeto, construção e operação de sistemas de tanques sépticos. Rio de Janeiro**,** 1993. 15 p.

AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT´ANNA JR, G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. **Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations**. Current Microbiology, vol.54, p.361 - 365, 2007.

BANAT, I. M. **Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review**.Bioresource Technology, vol.51, nº 1, p.1–12, 1995.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R. **Microbial biosurfactants production, applications and future potential**. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 87, nº 2, p. 427-444, 2010.

BARBOSA, R. **Tratamento anaeróbio de esgoto sanitário em reator de fluxo ascendente com leito de lodo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro. Brasil. 1988. 242 p.

BATTIMELLI, A.; CARRÈRE, H.; DELGENÈS, J. P. **Saponification of fatty slaughterhouse wastes for enhancing anaerobic biodegradability**. Bioresource Technology, vol. 100, nº 15, p. 3695-3700, 2009.

BENDICHO, S.; MARTÍ, G.; HERNÁNDEZ, T.; MARTIN, O. et al. **Determination of proteolytic activity in different milk systems.** Food Chemistry**.** vol. 103, p. 338-343, 2002.

BERG, S.; BROBST, G.; EDMONDS, J.; MCGUIRE, A.; MENARD, R.; TRACY, B. **SuperPro® Designer User's Manual**. 2003.169 p.

BEUCHAT, L.R. **Flavor chemistry of fermented peanuts**. Industrial & Engineering Chemistry Process Research Development, vol. 21, p. 533-536, 1982.

BEUX, S.; NUNES, E.; BARANA, A. C. **Effect of temperature on two-phase anaerobic reactors treating slaughterhouse wastewater**. Brazilian Archives of Biology and Technology, vol. 50, nº 6, p.1061-1072, 2007.

BEVILAQUA, J. V.; CAMAROTTA, M. C.; SANT'ANNA JR, G. L.; FREIRE, D. M. G. **Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, vol.19, nº2, p.151 - 158, 2002.

BOGNOLO, G. **Biosurfactant as emulsifying agent for hydrocarbons**. Colloids and Surfaces A, vol. 152, nº 1-2, p. 41-52, 1999.

BRITO, R.M.; VAZ, W.L. **Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine**. Analytical Biochemistry, vol.152, nº 2, p. 250-255, 1986.

BRYANT, M. P. **Microbial methane production: theoretical aspects**. Journal of Animal Science, vol. 48, p. 193- 201, 1979.

CAIXETA, E. T.; CAMMAROTA, M. C.; XAVIER, A. M. F. **Slaughterhouse wastewater treatment: evaluation of a new three-phase separation system in a UASB reactor.** Bioresource Technology, vol. 81, nº 1, p. 61-69, 2002.

CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; GIRONA, V.; PATKAR, S.A.; ALSINA, M.A. **Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase.** Biochemistry, vol. 39, nº 2, p. 413–423, 2000.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. **A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewaters with high oil and grease content**. Bioresource Technology, vol. 97, nº 17, p. 2195-2210, 2006.

CAMMAROTA,M. C.C., ROSA D. R., DUARTE I. C. S., SAAVEDRA, N. K., VARESCHE, M. B. A., ZAIAT, M., FREIRE, D. M. G. **The effect of enzymatic pre-hydrolysis of dairy wastewater on the granular and immobilized microbial community in anaerobic bioreators.** Envorimmental, vol. 34, nº 4, p. 417-428, 2013.

CAMPOS, C. M. M. ; MOCHIZUKI, E. T. ; DAMASCENO, L. H. S. ; BOTELHO, C. G. **Avaliação do potencial de produção de biogás e da eficiência de tratamento do reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) alimentado com dejetos de suínos.** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, vol. 29, nº 4, p. 848-856, 2005.

CARA, D. V. C. **Produção de biossurfatante por *Flavobacterium sp*. a partir de óleo de soja residual e fertilizante comercial.** Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2009. 71 p.

CARDENAS, F.; CASTRO, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; ALVAREZ, E. **Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media**. Enzyme and microbial technology, vol. 28, nº 2-3, p. 145-154, 2001.

CASSINI, S.T. (Coordenador). **Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do Biogás**. Rio de Janeiro: ABES/Rima, Projeto PROSAB, 2003. 210p.

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

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação.** Química Nova, vol. 27, nº 1, p. 146-156, 2004.

CAVALCANTI, E. D. C.; MACIEL, F. M.; VILLENEUVE, P.,; LAGO, R. C. A.; MACHADO, O. L.; FREIRE, D. M. G. **Acetone powder from dormant seeds of ricinus communis L.: Lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds.** Applied Biochemistry and Biotechnology, vol.136, p.57 - 65, 2007.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. **A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice**. Journal of Biological Chemistry. vol. 171, p. 501-505, 1947**.**

CHATTERJEE, S.; BARBORA, L.; CAMEOTRA, S. S.; MAHANTA, P.; GOSWAMI, P. **Silk-fiber immobilized lipase-catalyzed hydrolysis of emulsified sunflower oil**. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol.157, nº 3, p. 593 - 600, 2009.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios- edição revisada e ampliada**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 2007.379 p.

CHIPASA K.B.; MĘDRZYCKA K. **Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 33, nº 8, p.635-645, 2006.

CHUN, C. L.; LEE, J. J.; PARK, J. W. **Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants.** Environmental Pollution, vol. 118, nº 3, p. 307-313, 2002.

CIRNE, D. G.; PALOUMET, X.; BJORSSON, L.; ALVES M. M.; MATTIASSON, B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste – Effects of lipid concentration. Renewable Energy, vol. 32, p. 965-979, 2007.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2006, 206 p.

COOPER, D. G., GOLDENBERG, B. B. **Surface-active agents from two bacillus species.** Applied and Environmetal Microbiology, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G., ZAJIC, J. E., GERSON, F. **Production of surface-active lipids by Corybacterium lepus.** Applied and Environmetal Microbiology, vol. 37, p. 4-10, 1979.

DAMASCENO, F. R. C.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.**The combined use of a biosurfactant and enzyme preparation to treat effluent with a high fat content.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, vol. 95, p. 241-246, 2012.

DAMASCENO, F. R. C.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. **Impact of the addition of an enzyme pool on an activated sludge system treating dairy wastewater under fat shock loads**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol.83, nº 5, p.730 - 738, 2008.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. **Preteatment of synthetic dairy wastewater using the sophorolipid-producing yeast Candida bombicola.** Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 163, nº 6 p. 720-728, 2011.

DEBIK, E.; COSKUN, T. **Use of the Static Granular Bed Reactor (SGBR) with anaerobic sludge to treat poultry slaughterhouse wastewater and kinetic modeling**. Bioresource Technology, vol. 100, nº11, p. 2777–2782, 2009.

DEL NERY, V.; DE NARDI, I. R.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; POZZI, E.; AMORIMD, A. K. B.; ZAIAT, M. **Long-term operating performance of a poultry slaughterhouse wastewater treatment plant**. Resource Conservation and Recycle., vol. 50, nº 1, p. 102–114, 2007.

DEL POZO, R.; DIEZ, V. **Integrated anaerobic–aerobic fixed-film reactor for slaughterhouse wastewater treatment**. Water Research, vol. 39, nº 6, p. 1114–1122, 2005.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T.T. **Anaerobic treatment of dairy wastewater: a review.** Process Biochemistry, vol. 40, nº 8, p. 2583-2595, 2005.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. **Microbial production of surfactants and their commercial potential.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 61, nº 1, p. 47-64, 1997.

Di BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e Técnicas de Tratamento de Água.** São Carlos: Rima Editora, 2. ed., vol. 2, 2005.1584p.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O. R. **Volatile acids by direct titration**. Journal Water Pollution Control Federation, vol. 23, nº 4, p. 356-365, 1961.

DORS, G. **Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. 79p.

DUVNJAK, Z., COOPER, D. G., KOSARIC, N. **Prodution of surfactant by arthrobacter paraffineus ATCC19558**. Biotechnology and Bioengineering, vol. 24, p. 165-175, 1982.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. **Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação, uma avaliação econômica.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química - EQ, 2008. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008, 144f.

FERNANDES, A. C. L. B. **estudo de fatores de virulencia e de estresse oxidativo na produção de biossurfactante do tipo ramnolipideo por *Pseudomonas aeruginosa* PA1**. Dissertação (Mestrado em Química), IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2010. 110p.

FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. **A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation.** Methods in Enzymology, vol. 286, p. 327-347, 1997.

FERRER, P.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. SOLÀ, C. **Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*.** Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 95, nº 3, p. 221-255, 2002.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de microorganismos lipolíticos e produção de lipase por *Penicillium restrictum***. Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1996.

FREIRE, D. M. G.; ARAUJO, L. V.; KRONENBERGER, F. A.; NITSCHKE, M. M. **Biosurfactants as emerging additives in food processing**. Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products, Nova York : CRC Press, 1.ed., cap 23, p. 685-705, 2009.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. **Lipases em biocatálise** : **Enzimas em biotecnologia. produção, aplicações e mercado**, 1.ed, Rio de Janeiro : Editora Interciência, vol.1, p. 369-385, 2008.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. **Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido**, Revista Brasileira de Farmácia, vol. 81, nº 1 e 2, p. 48-56, 2000.

FREIRE, D.M.G., GOMES, P.M., BON, E. P. S.; SANTA'ANNA JR. **Lipase production by anew promising strain of Penicillium restrictum.** Journal of the Brazilian Society for Microbiology, vol. 28, ed. 1, p. 6-12, 1997**.**

FUCHS, W.; BINDER, H.; MAVRIAS, G.; BRAUN, R. **Anaerobic treatment of wastewater with high organic content using a stirred tank reactor coupled with a membrane filtration unit.** Water Research, vol. 37, nº4, p. 902-908, 2003.

GALLERT, C.; WINTER, J. **Bacterial metabolism in wastewater treatment systems.** Environmental Biotechnology. Concepts and Applications. Editors: H.-J. Jördening and J. Winter. 2005.

GOMBERT, A.K.; LOPES, A.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D. M. G. **Lipase production by *Penicillium restrictum* in a solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate**. Process Biochemistry, vol. 35, nº 1 e 2, p. 85-90, 1999.

GOUVEIA, J. P. G.; MOURA, R. S. F.; ALMEIDA, F. A. C.; OLIVEIRA, A. M. V.; SILVA, M. M. **Avaliação da cinética de secagem de caju mediante um planejamento experimental**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, vol. 6, nº 3, p. 471-474, 2002.

GRANT, S. R.; GORUR, S.; YOUNG, J. C.; LANDINER, R. COCCI, A. C.; CHURN, C. C. **A comparison of anaerobic technologies for industrial wastewater.** Water and wastewater news, nov.1, 2002.

GRIFFITHS, R.I .; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. **Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition**. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, nº12, p. 5488-5491, 2000.

GUTARRA, M. L. E. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido: seleção de fungos produtores e estudo das condições de cultivo.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003, 127 p.

GUTARRA, M. L. E.; CAVALCANTI, E.D.C.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA JR, G.L. **Lipase production solid state fermentation: Cultivation conditions and operation of a packed – bed bioreactors**. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 121, p. 105-116, 2005.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. **Inoculum strategies for Penicillium simplicissimum lipase production by solid state fermentation using a residue of the babassu oil industry**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 82, nº 3, p. 313 - 318, 2007.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; SILVA, J. N.; GUEDES, I. A.; LINS, U.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. **Lipase production and *Penicillium simplicissimum* morphology in solid-state and submerged fermentations**. Biotechnology Journal, vol. 4, nº10, p. 1450 - 1459, 2009.

HAJAYA, M. G.; PAVLOSTATHIS, S. G. **Fate and effect of benzalkonium chlorides in a continuous-flow biological nitrogen removal system treating poultry processing wastewater**. Bioresource Technology, vol. 118, p. 73–81, 2012.

HANAKI, K.; MATSUO, T.; NAGASE, M. **Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process**. Biotechnology and Bioengineering, vol. 23, nº 7, p.1591-1610, 1981.

HARALDSSON, G. G. **The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils.** Marine Lipids Biotechnology, cap. 7, p. 337-352, 1991.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, vol. 39, nº 2, p. 235-251, 2006.

HAWKES, F.R.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G. K. **Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater.** Water Research, vol. 29, nº 2, p. 525- 533, 1995.

HAZTEC, Soluções Ambientais Completas. Disponível em: http://www.haztec.com.br/ambiental/index.php/linhas-de-negocio/residuos-solidos, acesso: janeiro, 2013.

HELISTÖ, P.; KORPELA, T**. Effect of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method**. Enzyme and Microbial Technology, vol. 23, nº 1-2, p.113-117, 1998.

HWU, C.S.; DOLON, B.; LETTINGA, G. **Comparative toxicity of long-chainfatty acid to anaerobic sludges from various origins**. Water Science Technology, vol. 34,nº 5-6 p. 351-358, 1996.

HWU, C. S.; TSENG, S. K.; YUAN, C. Y.; KULIK, Z.; LETTINGA, G. **Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process**. Water Research, vol. 32, nº 5, p.1571-1579, 1998.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. **Microbial lipases from versatile tools for biotechnology**. Trends. Biotechnology, vol.16, nº 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, vol. 137, nº 1, p. 121-128, 2006.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. **Long-term performance of high-rate anaerobic reactors for the treatment of oily wastewater**. Environmental Science Technology, vol. 40, nº 20, p. 6466-6472, 2006.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. **Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR-UASB system**. Chemosphere, vol. 67, nº 8, p. 1492-1501, 2007.

JORDAN, S.N.; MULLEN, G.J. **Enzymatic hydrolysis of organic waste materials in a solid-liquid system**. Waste Management, vol. 27, nº 12, p. 1820-1828, 2007.

KAMINI, N.R.; MALA, J.G.S.; PUVANAKRISHNAN, R. **Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake**. Process Biochemistry, vol. 33, nº 5, p. 505-511, 1998.

KARAM, J.; NICELL, J.A. **Potential application of enzymes in waste treatment.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 69, nº 2, p. 141-153, 1997.

KATO, M. T.; NETO, C; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; CYBIS, L.F. **Configurações de reatores anaeróbios**.In: Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo - cap. 3. Projeto PROSAB, ABES, Rio de Janeiro/RJ, p. 53-100, 1999.

KOMATSU, T.; HANAKI, K.; MATSUO, T. **Prevention of lipid inhibition in anaerobic process by introducing a two-phase system**. Water Science and Technology, vol. 23, nº 7-9, p.1189-1200, 1991.

KRONEMBERGER, F. A.; SANTA ANNA, L. M.; FERNANDES, A. C. L. B.; MENEZES, R. R. M.; BORGES, C. P.; FREIRE, D. M. G. **Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor**. Applied Biochemistry e Biotechnology, vol. 147 nº 1-3, p. 33 - 45, 2008.

LANG, S.; WAGNER, F. **Structure and properties of biosurfactants**. Biosurfactants and Biotechnology. MD Kosaric, N Cairns, WL Gray, N.C.C. (Eds.), New York, p. 21–45, 1987.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. **Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential.** Applied Microbiology Biotechnology, vol. 51, nº1, p. 22-32, 1999.

LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C.; SANT'ANNA JR., G.L. **Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater**. Process Biochemistry, vol. 41, nº 5, p. 1173-1178, 2006.

LETTINGA G.; HULSHOFF POL, L.W. **UASB-process design for various types of wastewaters.** Water Science and Technology, vol. 24, nº 8, p. 87–107, 1991.

LUCAS, A. P. C.; KOETZ, P. R.; PRZYBYLSKI, S. L. A. **Tratamento anaeróbio de efluentes do processamento de corvina (*Micropogonias furnieri*) em reator UASB**. Vetor, vol. 10, p. 113-124, 2000.

MAGALHÃES, L. **Avaliação da atividade antimicrobiana de ramnolipídeos sobre *Listeria monocytogenes***. Dissertação de mestrado, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012, 73 p.

MAGNAN, R. B. **Análise da viabilidade técnica e financeira da substituição do coagulante cloreto férrico por policloreto de alumínio durante o processo físico-químico no tratamento de efluente de abatedouro avícola.** Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2010, 53 p.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. ***Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and potencial applications**. Applied Microbiol Biotechnology, vol. 54, nº 5, p. 625-633, 2000.

MARTINEZ, E.; MARCOS, A.; AL-KASSIR, A.; JARAMILLO, M. A.; MOHAMAD, A. A. **Mathematical model of a laboratory-scale plant for slaughterhouse effluents biodigestion for biogas production**. Applied Energy, vol. 95, p. 210–219, 2012.

MASSE, L., MASSÉ, D. I. **Effect of soluble organic, particulate organic, and hydraulic shock loads on anaerobic sequencing batch reactor treating slaughterhouse wastewater at 20°C**. Process Biochemical, vol. 40, nº 3-4, p. 1225-1232, 2005.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. P. **The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 76, nº 6, p. 629-635, 2001a.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. **Testing of alkaline enzymatic hydrolysis pretreatment for fat particles in slaughterhouse wastewater**. Bioresource Technology, vol. 77, nº 2, p. 145-155, 2001b.

MASSE, L.; MASSÉ, D.I.; KENNEDY, K.J. **Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater**. Process Biochemistry, vol. 38, nº 9, p. 1365-1372, 2003.

MATSUMIYA, Y.; WAKITA, D., KIMURA, A.; SANPA, S.; KUBO, M. **Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment.** Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 103, nº 4, p. 325-330, 2007.

MATSUMURA, E.M.; MIERZWA, J.C. **Water conservation and reuse in poultry processing plant – a case study**. Resources, Conservation and Recycling, vol.52, nº 6, p. 835–842, 2008.

McINERNEY, M. J.; BRYANT, M. P. **Basic principles of bioconversion in anaerobic digestion and methanogesis processes.** Biomass conversion processes for energy fuels, Plenum Press, New York, p. 277-296, 1981.

MEIRA, J. A. **Produção de biosurfactantes por fermentação no estado sólido e desenvolvimento de aplicações para tratamento de solos contaminados por hidrocarbonetos**. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007, 94 p.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JR., A. **Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos**. Química Nova, vol. 28, nº 2, p. 296-305, 2005.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; FURIGO JR., A. ; CASTRO, H. F. **Anaerobic biodegradability of dairy wastewater pretreated with porcine pancreas lipase.** Brazilian Archives of Biology and Technology, vol. 53, nº 6, p. 1279-1284, 2010.

MESSIAS J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. **Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications.** Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, vol. 32, nº 2, p. 213-234, 2011.

MILLIOLI, V.S.; SERVULO, E. F. L. C.; SOBRAL, L. G. S.; CARVALHO, D. D. **Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the Effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency**. Global NEST Journal, vol. 11, nº 2, p. 181-188, 2009.

MIRANDA, L. A. S.; HENRIQUES, J. A. P.; MONTEGGIA L. O. A Full-Scale UASB **reactor for treatment of pig and cattle slaughterhouse wastewater with a high oil and grease content**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, vol. 22, nº 4, p. 601 - 610, 2005.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N**. Overview of solid state bioprocessing.** Biotechnology Annual Reviews*,* vol. 8, p. 183-225, 2002.

MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. **Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614.** Chemistry and Physics of Lipids, vol. 147,nº 1, p. 1-13, 2007.

MOTTA, M.; PONS, M.N.; ROCHE, N.; VIVIER, H.; AMARAL, A.L.; FERREIRA, E. C.; MOTA, M. **Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso**. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, vol. 8, nº 3, p.170-181, 2003.

MULLIGAN, C. N. **Environmental applications for biosurfactants**. Environmental Pollution, vol. 133, nº 2, p. 183-198, 2005.

MUYZER G.; SMALLA K. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology-mini review**. Antonie Van Leeuwenhoek, vol.73, nº 1, p.127-141, 1998.

NAKHLA, G.; AL-SABAWI, M.; BASSI, A.; LIU, V. **Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater.** Journal of Hazardous Materials, vol. 102, nº 2-3 p. 243–255, 2003.

NARDI I.R.; FUZI, T.P; DEL NERY V. **Performance evaluation and operating strategies of dissolved-air flotation system treating poultry slaughterhouse wastewater**. Resources, Conservation and Recycling, vol. 52, nº 3, p. 533–544, 2008.

NARDI, I. R.; DEL NERY, V.; AMORIM, A. K. B.; SANTOS, N.G.; CHIMENES, F. **Performances of SBR, chemical–DAF and UV disinfection for poultry slaughterhouse wastewater reclamation**. Desalination, vol. 269, nº 1-3, p.184–189, 2011.

NGUYEN, T. T.; YOUSSEF, N. H.; MCINERNEY, M. J.; SABATINI, D. A. **Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation**. Water Research, vol. 42, nº 6-7, p. 1735-1743, 2008.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G.V.A. O **Biosurfactants in food industry**. Food Science and Technology, vol. 18, nº 5, p. 252-259, 2007.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. **structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste.** Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 160, n º 7, p.2066–2074, 2010.

NITSCHKE, M; PASTORE G.M. **Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações**. Química Nova, Campinas/SP, vol. 25, nº 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, A. B. M.; AMORIM, A. C.; ORRICO JR, M. A. P.; SUNADA, N. R.; CENTURION, S. R. **Biodigestão anaeróbia de efluente de abatedouro avícola**. Revista Ceres, vol. 58, nº6, p. 690-700, 2011.

OTZEN, D. E. **Protein unfolding in detergents: Effect of micelle structure, ionic strength, ph, and temperature biophysical**. Biophys Journal, vol.83, nº 4, p. 2219 -2230, 2002.

PADILHA, A. C. M.; SILVA, T. N.; SAMPAIO, A. **Desafios à adequação à questão ambiental no abate de frangos: o caso da perdigão agroindustrial – unidade industrial de Serrafina Correa, RS.** Teoria e Evidencia Econômica, Ed. Especial, vol. 14, Passo Fundo, p. 109-125, 2006.

PALATSI, J.; VIÑAS, M.; GUIVERNAU, M.; FERNANDEZ, B.; FLOTATS, X., **Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: main process limitations and microbial community interactions**. Bioresoure Technology, vol. 102, nº 3, p. 2219–2227, 2011.

PALMA, M. B.; LOPES, A. P.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVANITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. **Lipase production by *Penicilium restrictum* using a solid waste of the industrial babassu oil prodction as substrate**. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 84-86, p. 791 - 800, 2000.

PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F.; FURIGO JR. A**. Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola empregando lipase de *Candida rugosa***. In: Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM, Florianópolis, SC, 2003.

PEREIRA, E.B. **Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil, 2004.154p.

PEREIRA, M. A.; MOTA, M.; ALVES, M. M. **Operation of an anaerobic filter and an EGSB reactor for the treatment of an oleic acid-based effluent: influence of inoculum quality**, Process Biochem., vol. 37, nº 9, p.1025-1031, 2002.

PEREIRA, M. A.; SOUSA, D. Z.; MOTA, M.; ALVES, M. M. **Mineralization of LCFA associated with anaerobic sludge: kinetics, enhancement of methanogenic activity, and effect of VFA**. Biotechnology and Bioengeneering, vol. 88, nº 4, p. 502-511, 2004.

PEREIRA, R. F. G. P. F. **Interações entre íons metálicos e surfactantes aniônicos**. Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra, Química Macromolecular, Coimbra, 2011, 198 p.

PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K. D.; WEST, R. E. **Plant design and economics for chemical engineers**, 5 ed., 2003, 988 p.

PETRUY, R., LETTINGA, G. **Digestion of milk-fat emulsion**. Bioresource Technology, vol. 61, nº 2, p. 141-149, 1997.

PIRES, A.M. B. **Efeito de agentes químicos no tratamento anaeróbio de efluentes.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2005, 79 p.

PIRRÔLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Rio Claro, SP, 2006, 61p.

QUÉMÉNUER, M.; MARTY, Y. **Fatty acids and sterols in domestic wastewater**. Water Research, vol.28, nº 5, p.1217-1226, 1994.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. **Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives**. Biotechnology Advances, vol. 24, nº 2, p. 161-179, 2006.

RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA, J.; KORKOUTAS, Y.; MARCHANT, I. P. R.; BANAT, I. M. **Enhanced bioremediation of n-alcane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients**. Bioresource Technology, vol. 90, nº 2, p. 159-168, 2003.

RAICHER, G. **Análise econômica da produção de polímeros biodegradáveis no contexto de uma biorefinaria a partir de cana-de-açúcar** . Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. São Paulo, 2011.178p.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. **Comparison of two lipases in the hydrolysis of oil and grease in wastewater of the swine meat industry**. Industrial and Engineering Chemistry Research, vol. 47, nº 6, p.1760-1765, 2008.

RINZEMA, A.; ALPHENAAR, A.; LETTINGA, G. **Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular sludge bed reactors**. Process Biochemistry, vol. 28, nº 8, p. 527-537, 1993.

RINZEMA, A.; ALPHENAAR, A.;LETTINGA, G. **The effect of lauric acid shock loads on the biological and physical performance ofgranular sludge in UASB reactors digesting acetate**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 46, nº 4, p. 257-266, 1989.

RINZEMA, A.; van VEEN, H.; LETTINGA, G. **Anaerobic digestion of triglyceride emulsions in expanded granular sludge bed upflow reactor with modified sludge separators**. Environmental Technology, vol. 14, p. 423-432, 1993.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. **Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestor of high-strength wastes.** Journal Water Pollution Controll Federation, vol. 58, n. 5, p. 406-411, 1986.

RIVERA-MUÑOZ, G.; TINOCO-VALENCIA, J. R.; SÁNCHEZ, S; FARRÉS, A. **Production of microbial lipases in a solid state fermenter system**. Biotechnology Letters, vol. 13, nº 4, p. 277-280, 1991.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. **Optimización de la producción de biotensioactivos por Pseudomonas aeruginosa 44T1.** Fermentation and Bioindustrial CBEM, vol. 42, nº 1, P. 1-7, 1991.

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. **Biosurfactants: potential applications in medicine.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol.57, nº 4, p. 609-618, 2006.

ROCHA, M. A. G.; FLORENCIO, L.; KATO, M. T. SILVA, A. M. R. B. **Avaliação e comparação entre a atividade metanogênica específica de esgotos domésticos e industrial.** Anais do 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, João Pessoa, 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**.Campinas, São Paulo, 2.ed. 2009. 358 p.

ROSA, D. R. **Avaliação molecular e desempenho de sistemas de tratamento anaeróbio de efluentes com alto teor de gordura submetidos a pré-tratamento enzimático em biorreatores de biomassa suspensa, granular e imobilizada.** Tese de Doutorado, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008. 142 p.

ROSA, D. R. **Tratamento enzimático/biológico de efluente com alto teor de gordura**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica/IQ/UFRJ, 2004, 106 p.

ROSA, D. R.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. **Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease**. Environmental Engineering Science, vol. 23, nº 5, 814-823, 2006.

ROSA, D.R.; DUARTE, I.C.S.; SAAVEDRA, N.K.; VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. **Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis.** Bioresource Technology, vol.100, nº 24, p.6170-6176, 2009.

ROUF, S. A. **Evaluation of process simulators for an integrated bioprocess design.** Thesis Doctor of Philosophy in Chernical Engineering, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, 1999.

SADDOUD, A.; SAYADI, S. **Application of acidogenic fixed-bed reactor prior to anaerobic membrane bioreactor for sustainable slaughterhouse wastewater treatment**. Journal of Hazardous Materials, vol. 149, nº 3, p. 700–706, 2007.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T. MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase**. Science, vol. 239, nº 4839, p. 487-491, 1988.

SALAMEH, M.A.; WIEGEL, J. **Effects of detergents on activity, thermostability and aggregation of two alkali thermophilic lipases from *Thermosyntropha lipolytica***. The Open Biochemistry Journal, vol. 4, p. 22-28, 2010.

SALMINEN, E. A.; RINTALA, J. A. **Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste – a review**. Bioresource Technology, vol. 83, nº 1, p. 13-26, 2002a.

SALMINEN, E. A.; RINTALA, J. A. **Semi-continuous anaerobic digestion of solid poultry slaughterhouse waste: effect of hydraulic retention time and loading**. Water Research, vol. 36, nº 13, p.3175-3182, 2002b.

SAM-SOON, P.; LOEWENTHAL, R. E.; WENTZEL, M. C.; MARAIS, G.V.R. **A long-chain fatty acid, oleate, as sole substrate inupflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor systems.** Water SA, vol. 17, p. 31-36, 1991.

SANT'ANNA JR, G. L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações.** Rio de Janeiro, RJ, Ed. Interciência, 2010. 418p.

SANTA ANNA, L. M. M. Produção de biossurfactante do tipo ramnolipídeo por Pseudomonas sp.. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2000.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOS, S.; PEREIRA Jr, N.; FREIRE, D.M.G. **Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in environments in oil environments**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, vol. 19, nº 2, p. 159-166, 2002.

SANTA ANNA, L. M. M.; SORIANO, A. U.; GOMES, A. C.; MENEZES, E. P.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; PEREIRA JR, N. **Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 82, nº 7, p. 687 - 691, 2007.

SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. W.; VASQUEZ, G. S; SANTA ANNA, L. M.; PEREIRA Jr., N.; FREIRE, D. M. G. **Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*.** Applied Biochemistry and Biotechnology, vol.100, nº 1-3, p. 1025-1036, 2002.

SANTOS, L. C. **Avaliação da concentração ótima de biossurfactante no processo de biorremediação de solo contaminado por óleo cru.** In: XII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2004.

SARACHAT, T.; PORNUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. **Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation**. Bioresource Technology, vol.101, nº 1, p. 324-330, 2010.

SAXENA, R.K; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; BHOOPANDER, G. **Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus***. Process Biochemistry, vol. 39, nº 2, p. 239-247, 2003.

SAYED, S. K. I.; VAN DER ZANDEN, J.; WIJFFELS, R.; LETTINGA, G. **Anaerobic degradation of the various fractions of slaughterhouse wastewater.** Biology Wastes, vol. 23, nº 2, p. 117-142, 1988.

SCHELLINKHOUT, A; LETTINGA, G.; van VELSEN, A.F.M.; LOUWE KOOIJMANS, J.; RODRIGUEZ, G. P. **The application of the UASB reactor for direct treatment of domestic wastewater under tropical conditions**. Anaerobic Treatment of Sewage Seminar Massachusets: Proceedings, p. 259-276, 1985.

SCHOENHALS, M.; SENA, R. F.; JOSE, H. J. **Avaliação da eficiência do processo de coagulação/flotação aplicado como tratamento primário de efluentes de abatedouro de frangos**. Engenharia Ambiental, Espirito Santo do Pinhal, vol. 3, nº 2 p-05-24, 2006.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C**. Production, purification, characterization and applications of lipases**. Biotechnology Advances, vol. 19, nº 8, p. 627-662, 2001.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, V.; TREICHEL, H.,; OLIVEIRA, D. **Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal.** Bioprocess and Biosystems Engineering , vol. 34, nº 2, p. 145-152, 2011.

SINGH, A.; HAMME, J. D. V.; WARD, O. P. **Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2**. Application aspects. Biotechnology Advances, vol. 25, nº 1, p. 99-121, 2007.

SOARES, H. M.; ZAIAT, M. **Processos anaeróbios de tratamento de matéria orgânica**. In: V Curso de Tratamento Biológico de Resíduos. Florianópolis/SC. Projeto PROSUL/CNPq – UFSC/UDELAR/UNLP, cap. vol.2, 2005. 37p.

SOUSA, D. Z.; PEREIRA, M. A.; STAMS, A. J. M.; ALVES, M. M.; SMID, H. **Microbial communities involved in anaerobic degradationof unsaturated or saturated long-chain fatty acids.** Applied and Environment al Microbiology, vol. 73, nº 4, p. 1054–1064, 2007.

SOUSA, J.; CAVALCANTI, E. D. C.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. **Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas L.*) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production.** Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic. , vol.65, nº 1-4, p.133 - 137, 2010.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Archae Press, Nashville, USA, 1996, 394 p.

STÖCKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U.; SCHMID, R.D. **purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum***. Biochimica et Biophysica Acta BBA, vol.1168, nº 2, p.181-189, 1993.

STRONACH, S. M.; RUDD, T.; LESTER, J. N. **Anaerobic digestion processes in industrial wastewater treatment.** Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1986.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. **A Review on microbial lipases production**. Food and Bioprocess Technology, vol. 3, nº 2, p. 182-196, 2010.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura, disponivel em: http://www.abef.com.br/ubabefnovo/index.php, acesso: janeiro, 2013.

VALENTE, A. M; ALEXANDRE, V. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. **Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano**. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, vol.30, nº 2, Campinas, p. 483-488, 2010.

VALLADÃO, A. B. G. **Efeito de pré-hidrólise enzimática de gordura na biodegradação anaeróbia de efluente de indústria de abate de aves**. Tese de Doutorado, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2009.

VALLADÃO, A. B. G. **Pré-hidrolise enzimática aplicada ao tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

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 and Biodegradation, vol.60, nº 4, p. 219 - 225, 2007.

VALLADÃO, A. B.; FREIRE, D. M. G.; CAMAROTTA, M. C. **Evaluation of different pre-hydrolysis times and enzyme pool concentrations on the biodegradability of poultry slaughterhouse wastewater with a high fat content**. Water Science and Technology Water Supply, vol.60, nº 1, p. 243 - 249, 2009.

VALLADÃO, A.B.G.; CAMMAROTA, M.C.; TORRES, A.G.; FREIRE, D.M.G. **Profiles of fatty acids and triacylglycerols and their influence on the anaerobic biodegradability of effluents from poultry slaughterhouse**. Bioresource Technology, vol. 102, nº 14, p. 7043-7050, 2011.

van HAANDEL, A.; KATO, M. T.; CAVALCANTI, P. F. F.; FLORENCIO, L. **Anaerobic reactor desing concepts for the treatment of domestic wasterwater**. Reviews in Environmental Sciences and Biotechnology, vol. 5, nº 1, p. 21-38, 2006.

VARGAS, G. D. L. P.; TEICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; DILUCCIO, M. **Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meat**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 83, p. 47 - 54, 2008.

YANG, G; ANDERSON, G. K. **Effects of wastewater composition ou stability of UASB**. Journal of Enviromental Engineering, vol. 119, nº 5, p. 958-975, 1993.

YAPOUDJIAN, S.; IVANOVA, M.G.; BRZOZOWSKI, A.M.; PATKAR, S.A.; VIND, J.; SVENDSEN, A.; VERGER, R. **Binding of *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase to the mixed micelles of cis-parinaric acid/NaTDC**. European Journal of Biochemistry, vol. 269, p. 1613-1621, 2002.

ZANA, R. **Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles and lyotropic phases.** Surfactant science series; vol. 125, New York: CRC Press, 2005. 539 p.

ZHANG, H.; XIANG, H.; ZHANG, G.; CAO, X.; MENG, Q. **Enhanced treatment of waste frying oil in an activated sludge system by addition of crude rhamnolipid solution**. Journal of Hazardous Materials, vol. 167, nº 1-3, p. 217-223, 2009a.

ZHANG, Q.; HE, G.; WANG, J.; CAI, W.; XU, Y. **Mechanisms of the stimulatory effects of rhamnolipid biosurfactant on rice straw hydrolysis**. Applied Energy, vol. 86, p. S233 - S237, 2009b.