



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Micheline Oliveira de Menezes Belo

**DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DOS
CONCENTRADOS OBTIDOS PELO PROCESSO DE
FLOTAÇÃO DE EFLUENTE DA INDÚSTRIA LÁCTEA**

Recife

2009

Micheline Oliveira de Menezes Belo

**DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DOS
CONCENTRADOS OBTIDOS PELO PROCESSO DE
FLOTAÇÃO DE EFLUENTE DA INDÚSTRIA LÁCTEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Informática, Modelagem e Controle de Processos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christine Lamenha Luna Finkler

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Amorim Salgueiro

Recife

2009

B452d

Belo, Micheline Oliveira de Menezes

Degradação hidrolítica dos concentrados obtidos pelo processo de flotação de efluentes da indústria láctea / Micheline Oliveira de Menezes Belo ; orientador Christine Lamenha Luna Finkler ; co-orientador Alexandra Amorim Salgueiro, 2009.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2009.

1. Flotação. 2. Resíduos industriais. 3. Eliminação de resíduos. 4. Águas residuais-Purificação. 5. Hidrólise. I. Título

CDU 628.16

Belo, Micheline Oliveira de Menezes

Degradação hidrolítica dos concentrados obtidos pelo processo de flotação de efluente da indústria láctea. Recife, 2008. 68p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

1. Hidrólise 2. Indústria láctea 3. Tratamento de efluentes. I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

MICHELINE OLIVEIRA DE MENEZES BELO

**DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DOS CONCENTRADOS
OBTIDOS PELO PROCESSO DE FLOTAÇÃO DE
EFLUENTE DA INDÚSTRIA LÁCTEA**

Dissertação apresentada à Universidade Católica de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

APROVADA em: 31/03/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro – UPE

Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Saruboo – UNICAP

Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Christine Lamenha Luna Finkler – UNICAP

Orientador

Recife

2009

Para Juliana, minha filha...

*“Vem vindo meu novo ser,
cercado de proteção,
de tanto amor, tanta paz,
dentro do meu coração”*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida em comunhão com o Espírito Santo e o amor de seu filho Jesus Cristo. À Maria, pelo seu amor materno que me protege diariamente com seu manto sagrado.

Ao meu marido, companheiro e amigo DANIEL... meu grande incentivador! A ele a gratidão da excelente colocação e desempenho ao longo deste curso. Meu muito obrigada pelo apoio constante, pela insistente cobrança diária ao “tomar minha lição”, e por ser meu esteio perene, pra você: meu amor eterno...

A minha princesinha Daniela. Minha filhinha linda, presente de Deus pra nós, e principalmente por sua companhia “visceral”, durante a gestação em que estive longe de casa no intercâmbio com a UNICAMP, fazendo com que eu não me sentisse sozinha.

Aos meus queridos pais Enoque e Albanisi, meus irmãos: Michel e Júnior e demais familiares, que junto comigo sonharam e vibraram com cada minuto desta conquista.

Aos meu amados cunhados: Ricardo e Juliana, que me deram total apoio quando estive fora de casa em minha estada em Campinas/São Paulo e ao meu sogrinho Sr. Belo pelo questionamento e incentivos tão presentes em nossas conversas e encontros.

A minha mais que orientadora Christine Finkler. Sempre atenta às minhas necessidades, como também pela sua incomensurável presteza, disponibilidade e dedicação em tudo o que se fez necessário para a concretização dos objetivos deste trabalho. Aqui Chris, o meu muito obrigada! Você realmente terá um lugar muito mais que especial na minha vida!

A minha querida co-orientadora Professora Alexandra. Exemplo de paciência e dedicação, enfrentando sempre um novo desafio em explicar e simplificar o que se parecia inexplicável! Obrigada pelos sorrisos e pelo tão carinhoso: “*Vamos tomar um leitinho?*”

Aos queridíssimos professores Valdemir Alexandre e Leonie Asfora pelo carinho e atenção sempre tão gratuitos e oportunos.

Aos colegas da Terceira Turma. A Andréa Vilar pela companhia, caronas, conversas e principalmente pela amizade que nasceu de tudo isso! Aos estagiários do NPCIAMB, de forma especial a Caroline Guirelli e Elma Larestre alunas de PIBIC, as doutorandas Raquel, Juliana e Adriana, e aos técnicos e demais professores, com os quais tive o prazer de conviver e aprender durante esses preciosos dois anos de curso.

A CAPES-PROSUP pela concessão da bolsa durante o curso.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO 1	5
1.1 Introdução	5
1.2 Revisão da Literatura	7
1.2.1. Efluentes lácteos e as fiscalizações quanto ao seu descarte em corpos d'água	7
1.2.2. A indústria de laticínios no Brasil	9
1.2.3. Efluente lácteo	11
1.2.4. Tipos de tratamento aplicados a efluentes lácteos	12
1.2.4.1. Flotação	13
1.2.4.2. Tratamento biológico	15
1.2.4.3. Tratamento enzimático e uso de lipases	16
1.2.4.4. Mercado de enzimas industriais	20
1.3 Objetivos	22
1.3.1 Objetivo Geral	22
1.3.2 Objetivos Específicos	22
1.4 Referências	23
CAPÍTULO 2	29
Caracterizações microbiológica e físico-química de efluente lácteo visando à obtenção de consórcio microbiano	
Resumo	30

Abstract	31
2.1 Introdução	32
2.2. Materiais e Métodos	33
2.2.1. Coleta e acondicionamento do efluente	33
2.2.2. Caracterização microbiológica	33
2.2.3. Caracterização físico-química	34
2.2.4. Obtenção do consórcio microbiano	34
2.2.5. Avaliação qualitativa da atividade enzimática	35
2.2.6. Atividade lipásica	36
2.3. Resultados e Discussão	36
2.4. Conclusões	41
2.5. Referências	41
CAPÍTULO 3	
Degradação hidrolítica de material flotado de efluente lácteo industrial	44
Resumo	45
Abstract	46
3.1 Introdução	47
3.2 Material e Métodos	48
3.2.1. Coleta e acondicionamento do efluente	48
3.2.2. Ensaio de Flotação	48
3.2.3. Obtenção do consórcio microbiano	49
3.2.4. Tratamento enzimático do flotado	49
3.2.5. Determinações analíticas	50
3.3 Resultados e Discussão	53
3.4 Conclusões	67
3.5 Referências	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação esquemática de uma coluna de flotação	14
Figura 1.2 – Hidrólise seqüencial dos grupos acila no glicerídeo catalisada por lipases	18
Figura 2.1 - Biorreator contendo efluente lácteo para obtenção do consórcio microbiano	35
Figura 2.2 - Resultados de contagem de bactérias heterotróficas durante cultivo do efluente lácteo em biorreator (200rpm, 1vvm, 28-30°C)	37
Figura 2.3 - Resultados de contagem de fungos e leveduras durante cultivo do efluente lácteo em biorreator (200rpm, 1vvm, 28-30°C)	37
Figura 2.4 - Demanda Química de Oxigênio (DQO) durante o cultivo do efluente lácteo em biorreator (250 rpm, 1vvm, 30°C)	39
Figura 2.5 – Resultados de atividade lipásica durante cultivo do efluente lácteo em biorreator (250rpm, 1vvm, 30°C)	40
Figura 3.1 – Reação de transesterificação de triglicerídeos	51
Figura 3.2 – Cromatograma típico da análise de ácidos graxos (Condições: coluna capilar de sílica fundida de dimensões 30m x 0,25mm x 1µm, temperatura do detector de 250°C; temperatura do vaporizador de 200°C; programação do forno: 50°C por 5min; 5°C/min até 110°C, permanecendo por 4 minutos, e 4°C/min até 150°C, permanecendo por 5 minutos)	54
Figura 3.3 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância; teor inicial de ácidos graxos de 13,36g/L)	56
Figura 3.4 – Diagrama de Pareto (A) e valores preditos versus valores observados (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância; teor inicial de ácidos graxos de 13,36g/L)	57
Figura 3.5 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o pH como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância)	58

- Figura 3.6 – Diagrama de Pareto (A) e valores preditos versus valores observados (B) para o pH como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância) 59
- Figura 3.7 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a atividade lipásica como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância) 60
- Figura 3.8 – Diagrama de Pareto (A) e valores preditos versus valores observados (B) para a atividade lipásica como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância) 61
- Figura 3.9 – Fotos do experimento de hidrólise. (A) antes da hidrólise e (B) após 48h de hidrólise 63
- Figura 3.10 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos como função da concentração de enzima e da concentração de consórcio (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância; teor inicial de ácidos graxos de 13,36g/L) 64
- Figura 3.11 – Diagrama de Pareto (A) e valores preditos versus valores observados (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos como função da concentração de enzima e da concentração de consórcio (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância; teor inicial de ácidos graxos de 13,36g/L) 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Fontes de lipídios e suas concentrações em águas residuárias	8
Tabela 2.1 - Caracterização físico-química do soro de queijo	38
Tabela 2.2 - Resultados de atividades enzimáticas das amostras do consórcio microbiano obtido a partir do cultivo em soro de queijo	40
Tabela 3.1 – Primeiro planejamento experimental utilizado nos ensaios de hidrólise	49
Tabela 3.2 – Segundo planejamento experimental utilizado nos ensaios de hidrólise	50
Tabela 3.3 – Concentrações dos ácidos graxos presentes no material flotado	53
Tabela 3.4 - Parâmetros da análise de variância para o percentual de liberação de ácidos graxos, pH e atividade lipásica no primeiro planejamento experimental para um tempo de hidrólise de 4 horas.	62
Tabela 3.5 - Parâmetros da análise de variância para o percentual de liberação de ácidos graxos no segundo planejamento experimental para um tempo de hidrólise de 4 horas.	66

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>v/v</i>	volume por volume
<i>vvm</i>	volume de ar por volume de meio por minuto
<i>rpm</i>	rotações por minuto
<i>kDa</i>	quilodalton
<i>f</i>	<i>fator</i> utilizado para o cálculo das concentrações dos ácidos graxos
<i>C</i>	concentração conhecida de uma amostra-padrão (g/L)
<i>A</i>	área do cromatograma
<i>AGL</i>	ácidos graxos livres
<i>AGF</i>	ácidos graxos do flotado (g/L)
<i>AGT</i>	ácidos graxos dos triglicerídeos (não hidrolisados) (g/L)

LISTA DE ABREVIATURAS

DQO	Demanda Química de Oxigênio
UFC	Unidade Formadora de Colônia
pH	Potencial hidrogeniônico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
ANA	Agência Nacional de Águas
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SISNAMA	Sistema Nacional do Meio Ambiente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
E C	Enzyme Commission
NPCIAMB	Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais
APHA	American Public Health Association
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CP	Contagem padrão
pNPP	Paranitrofenilpalmitato
UI	Unidade Internacional
AN	Agar Nutritivo

RESUMO

A primeira etapa do presente trabalho consistiu em caracterizar um efluente lácteo industrial (soro de queijo) em termos microbiológicos e físico-químicos visando à obtenção de um consórcio de microrganismos para a sua biodegradação. Foram determinadas a contagem padrão de bactérias heterotróficas e a contagem de fungos filamentosos e leveduras de acordo com as metodologias oficiais, e a caracterização físico-química foi realizada em termos do teor de proteínas, cinzas, lipídios, carboidratos, pH e demanda química de oxigênio (DQO). O consórcio microbiano foi obtido em biorreator operando em batelada e contendo 1,5L do efluente, a 200rpm, aeração de 1vvm e temperatura de 28 - 30°C. Os cultivos foram realizados em duplicata durante onze dias, sendo realizado um pulso de 150mL do efluente (10% do volume útil do biorreator) no sétimo dia do cultivo. Foram obtidas concentrações iniciais de 3×10^9 UFC/mL e 8×10^4 UFC/mL para contagem total de bactérias e de fungos e leveduras, respectivamente. O efluente apresentou uma DQO inicial de 64.000mgO₂/L, pH 5,0, e concentrações correspondentes a 5g/100mL de carboidratos, 0,8g/100 mL de proteínas e 0,6g/100 mL de lipídios. Os cultivos do efluente no biorreator demonstraram um aumento da concentração de bactérias ao longo do tempo, atingindo 1×10^{13} UFC/mL após oito dias, enquanto que as concentrações de fungos filamentosos e de leveduras foram inibidas. Foi observada uma redução da DQO de 47 a 63,5% após 11 dias de cultivo, demonstrando a potencialidade da utilização do consórcio microbiano no tratamento do efluente. Ensaio qualitativos demonstraram a presença das enzimas: lipase, amilase, protease e celulase no extrato metabólito do consórcio microbiano. No entanto, foram obtidos baixos valores de atividade lipolítica quando comparados com a atividade da enzima comercial, sendo observado ainda que a atividade decresce ao longo do tempo.

Na segunda etapa do trabalho foi avaliada a hidrólise enzimática de material flotado, obtido a partir do processo de flotação em coluna do efluente, utilizando a técnica de planejamento de experimentos. Inicialmente, foi avaliado o desempenho de uma lipase comercial (lipolase®), sendo investigados os efeitos da agitação e da concentração de enzima sobre a hidrólise. Foi realizada a análise estatística considerando os efeitos significativos para um nível de confiança de 95%. Concentrações maiores de enzima dentro da faixa investigada (1 a 7%) maximizam a hidrólise de óleos e gorduras do material flotado, bem como para níveis de agitação entre 100 e 150rpm. Em todos os experimentos houve a liberação de ácidos graxos no meio em percentuais próximos a 100% apenas após 4 horas de reação. Vale salientar ainda que percentuais de liberação de ácidos graxos superiores a 92% foram obtidos para toda a faixa de concentração testada. Uma agitação de 150rpm foi utilizada em um segundo planejamento experimental, avaliando-se a concentração da enzima comercial associada a um consórcio

microbiano, sendo verificado que a adição do consórcio não influenciou de maneira positiva o aumento do teor de ácidos graxos livres no meio.

Palavras-Chave: hidrólise, indústria láctea, tratamento de efluente, lipase, flotado.

ABSTRACT

The first step of the present work was characterizing a dairy effluent in terms microbiological and physical-chemical used to obtain a microbial consortium for its biodegradation. Microbiological characterization was performed by total heterotrophic bacteria, filamentous fungi and yeasts count according to the official methodologies. Physical-chemical characterization was accomplished by content of protein, ash, lipids, carbohydrates, pH and chemical oxygen demand (COD). Microbial consortium was obtained in batch using a bioreactor containing 1,5L of dairy effluent, at 200 rpm, 1vvm, at 28 - 30°C. Cultivations were performed in duplicate for eleven days, being applied a pulse of 10% (v/v) of effluent on the seventh day of the experiment. Cellular growth kinetics, chemical oxygen demand concentration and lipolytic activity were determined. Initial concentrations of bacteria and fungi and yeasts were equal to 3×10^9 CFU/mL and 8×10^4 CFU/mL, respectively. Effluent presented a COD of 64.000 mgO₂/L, pH 5,0 and concentrations of 5g/100mL of carbohydrates, 0,8g/100mL of protein and 0,6g/100mL of lipids. Cultivations showed an increase on the bacteria concentration, reaching 1×10^{13} CFU/mL after eight days, while filamentous fungi and yeast concentrations were inhibited. An reduction of COD concentration in the range of 47 to 63,5% was observed after eleven days of cultivation, demonstrating the potentiality of use of microbial consortium for effluent treatment. Qualitative assays showed the presence of the enzymes lipase, amylase, protease and cellulase in the metabolic extract of the microbial consortium. However, low values of lipolytic activity were obtained as compared to the commercial enzyme, being observed that activity decreases along time.

In the second step of this study, was evaluated the enzymatic hydrolysis of floated material, obtained from the column flotation of a dairy industry, using the technique of experimental design. Initially, performance was evaluated by a commercial lipase (lipolase®), being investigated the effects of agitation and enzyme concentration on hydrolysis. A statistical analysis was performed considering the significance of effects to a confidence level of 95%. Higher enzyme concentrations in the range investigated (1 to 7%) maximize the hydrolysis of oils and fats in the floated material, and to agitation levels between 100 and 150rpm. In all experiments, fatty acids were released in rates near to 100% only after 4 hours of reaction. Moreover, rates of released fatty acids were greater than 92% in all the concentration range tested. An agitation of 150rpm was used in a second experimental design, evaluating the concentration of commercial enzyme associated with a microbial consortium. The kinetic monitoring of the process showed that the addition of the consortium did not influence in a positive manner the increase the content of free fatty acids.

Keywords: hydrolysis, dairy industry, effluent treatment, lipase.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

As agressões ao meio ambiente têm representado uma grande preocupação no mundo inteiro, pois os processos tecnológicos e industriais estão intimamente ligados a uma maior emissão de poluentes. Apenas nos últimos anos a preocupação com estes danos e suas conseqüências tem se tornado mais pungente e, desta forma, surgiu a necessidade premente da utilização racional dos recursos naturais não renováveis. Com isso, a preocupação com a água, que é um dos recursos mais preciosos, deve ser constante, uma vez que suas fontes são finitas e o despejo de efluentes industriais sem tratamento prévio nestes corpos hídricos é preocupante.

O ideal seria que todas as empresas inseridas no mercado oferecessem produtos de qualidade a partir de tecnologias limpas, sem causar danos ao meio ambiente. Contudo, muitas dessas empresas, principalmente as de pequeno e de médio porte, não têm como se adequar a esta realidade pelos altos custos gerados com a implementação das normas adequadas de tratamento e de descarte de efluentes preconizadas pelas entidades responsáveis pela elaboração e fiscalização destas leis (SEBRAE, 1997).

Nos últimos cinco anos, pesquisas recentes têm apontado o nosso país como um potencial exportador de leite e de seus derivados. De maneira concomitante, foi verificado que o consumo interno pela população em busca destes produtos também teve um aumento considerável. Impulsionado por esses dois grandes motivos, a indústria leiteira está em ascensão e, com isso, um problema: a quantidade de efluentes lácteos gerados, que na maioria das vezes não passam por nenhum tipo de tratamento, causando sérios problemas ambientais, principalmente quando lançados em corpos hídricos.

As características dos efluentes lácteos são dependentes da natureza do processo industrial e do tipo de produto que é gerado, exigindo formas específicas de tratamento. No entanto, destaca-se nesses efluentes a elevada carga orgânica, representada principalmente pelas proteínas e gorduras. Em geral, são empregados inicialmente os tratamentos primários convencionais, tais como a sedimentação, filtração e flotação, que permitem a remoção parcial

dos sólidos em suspensão. Estes tratamentos podem ser aperfeiçoados pela utilização de substâncias químicas coagulantes, como polímeros e sais de ferro e alumínio, que promovem a coagulação do material presente no efluente. Nas fases subseqüentes podem ser utilizados os tratamentos secundário, terciário e quaternário, dependendo da característica desejada do efluente tratado.

No que concerne às formas de tratamentos biológicos, a utilização do lodo ativado nas indústrias de laticínios apresenta uma série de vantagens: as bactérias anaeróbias presentes no processo são menos susceptíveis à inibição por diversas substâncias químicas; o curto tempo de adaptação do lodo ao resíduo de interesse; a não necessidade de pós-tratamento; a menor possibilidade de geração de efluente com aspecto desagradável; a grande flexibilidade de operação; a elevada eficiência de tratamento e o porte relativamente pequeno das unidades (VON SPERLING, 1997).

A utilização de um pré-tratamento enzimático vem sendo proposta como uma alternativa para diversos tipos de resíduos, sendo o uso de lipases em efluentes de laticínios atualmente empregado com sucesso. Embora, a aplicação de enzimas comerciais muitas vezes inviabiliza o processo de tratamento em função dos altos custos apresentados. O emprego de consórcio microbiano produtor de enzimas hidrolíticas, associado ou não a enzimas comerciais, constitui-se uma alternativa mais econômica para o pré-tratamento destes resíduos.

Considerando a importância econômica e social das indústrias de laticínios em nosso Estado e buscando viabilizar medidas que minimizem o impacto ambiental causado por estes rejeitos líquidos, este trabalho se propõe a investigar a degradação hidrolítica de efluentes concentrados da indústria láctea, obtidos pelo processo de flotação, através da utilização de lipases e/ou consórcios microbianos produtores de enzimas.

1.2 Revisão da Literatura

1.2.1. Efluentes lácteos e as fiscalizações quanto ao seu descarte em corpos d'água

Nos últimos anos é crescente a preocupação das empresas em reduzir o impacto ambiental decorrente de seus processos industriais. Além disso, a população passou a perceber que a preservação dos recursos ambientais está diretamente ligada à qualidade de vida. Os governos implantaram uma legislação mais rigorosa e uma fiscalização mais atuante para punir de forma mais rígida os crimes cometidos contra o meio ambiente. Desta forma, as grandes corporações perceberam que são as maiores responsáveis pela gestão ambiental, passando a considerar o assunto primordial tanto para se adequarem a fiscalização ambiental quanto para captar um maior número de consumidores preocupados com a consciência ambiental das empresas que produzem bens do seu interesse.

Nosso país, dentro do contexto mundial, é uma boa representação de um território em ascensão. O seu crescimento populacional aliado ao eminente desenvolvimento tecnológico e industrial faz com que cada vez mais se busquem na natureza recursos que viabilizem a fabricação de novos equipamentos, moradia e matéria-prima para os mais diversos fins, fazendo com que haja gradativamente o desaparecimento de alguns recursos naturais e a escassez de outros, como é o caso da água.

Todo esse crescimento tem um preço, e o planeta tem respondido de maneira veemente que não consegue buscar o equilíbrio na mesma velocidade em que é constantemente agredido, principalmente no que concerne aos rejeitos industriais que são descartados em superfícies aquíferas ou próximas aos lençóis d'água. Com isso, os órgãos de controle ambiental têm introduzido medidas que visam à valorização da água como bem de consumo. É o caso da Política Nacional de Recursos Hídricos, implementada pela Lei 9.984 de 17 de julho de 2000, que trata dos aspectos gerais atinentes à utilização dos corpos de água como bem público, e da criação da Agência Nacional de Águas (ANA), uma entidade federal vinculada ao Ministério do Meio Ambiente que tem por finalidade supervisionar, controlar e avaliar as ações e atividades decorrentes do cumprimento da legislação federal pertinente aos recursos hídricos (BRASIL, 2000).

Além disso, o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente – SISNAMA, criou uma legislação que

classifica os corpos de água e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes sob o número 357 de 17 de abril de 2005 (CONAMA, 2005). O conjunto dessas ações é mais uma ferramenta para se reduzir o impacto ambiental, criando assim um movimento progressivo de conscientização da população para uma utilização racional destes recursos.

Dentre as diversas pesquisas que visam à redução do impacto ambiental causado pelo descarte de efluentes industriais, um dos principais desafios encontrados é o tratamento de efluentes contendo elevados teores de lipídios.

Os lipídios, juntamente com proteínas e carboidratos, compõem os principais compostos orgânicos de águas residuárias de diversas indústrias de alimentos (RAUNKJAER, HVITEVED-JACOBSEN, NIELSEN, 1994) e até mesmo da indústria de ração animal, sendo esta uma das maiores produtoras de efluentes ricos em óleos e gorduras (JEGANATHAN, BASSI, NAKHA, 2006). Esses compostos causam grandes danos ao meio ambiente, como a formação de filmes oleosos nas superfícies aquáticas que dificultam a dispersão de luz e conseqüente difusão de oxigênio para o meio, causando danos à biota local (MONGKOLTHANARUK e DHARMISTHITI, 2002). As principais fontes de geração de lipídios são indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes, matadouros e os efluentes domésticos e de restaurantes, como pode ser observado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Fontes de lipídios e suas concentrações em águas residuárias

Tipos de efluentes	Concentração de lipídios (mg/L)	Referência
Doméstico	40-100	HENZE (1992)
Matadouros e avícolas	Acima de 500	PETRUY e LETTINGA (1997)
Laticínios	4.680	MENDES <i>et al.</i> (2004)
Restaurantes	98	DHARMISTHITI e KUHASUNTISOOK (1998)
Azeite de oliva	16.000	De FELICE <i>et al.</i> (1997)
Sorvetes	845	HAWKES <i>et al.</i> (1995)

Os critérios de seleção de um efluente a ser lançado em um curso d'água obedecem a exigências da Legislação Ambiental da Lei Federal número 6.938 de 31 de agosto de 1981 (SÍLEX, 1981), onde são estabelecidos padrões de tratamento como primário, secundário, terciário e quaternário, recomendados de acordo com a natureza do efluente a ser tratado.

As políticas governamentais que limitam a entrada de uma indústria no setor de laticínios estão assumindo importância crescente e tendem a se tornar fatores limitantes também para as

empresas já instaladas. As duas principais barreiras decorrentes de políticas públicas neste setor referem-se à legislação ambiental e às limitações para comercialização de produtos em função de registros. Segundos essas exigências, os novos laticínios que quiserem instalar-se legalmente terão que se adequar à legislação ambiental e às exigências dos órgãos de fiscalização competentes. Em ambos os casos, os recursos exigidos para entrada de novas empresas no mercado, principalmente em se tratando de laticínios de pequeno porte, implicarão em investimentos substancialmente maiores em relação aos aplicados até então aos laticínios já instalados (SEBRAE/MG, 1997). Este fato assume maior importância quando se percebe que uma pequena parte dos laticínios instalados possui algum sistema de tratamento de efluentes e que a maioria deles não tem condição de se adequar de maneira imediata à legislação ambiental vigente.

1.2.2. A indústria de laticínios no Brasil e em Pernambuco

Grande parte do território nacional possui este tipo de indústria, que é responsável por uma parcela importante de nossa economia, tanto na geração de empregos quanto na oferta de produtos. A produção brasileira de leite cresceu na década de 90 a uma taxa média de 4,29% ao ano. A produção informal de produtos lácteos brasileiros cresceu 50% enquanto que a formal cresceu apenas 16% na década de 90, o que aumentou ainda mais o volume de efluentes gerados e descartados sem qualquer tratamento (SCALCO E TOLEDO, 2003). A produção de leite no país vem aumentando desde 2000, e atualmente ocupa a sexta colocação no *ranking* dos exportadores. Os produtos lácteos brasileiros são enviados para mais de 70 países, o que movimenta cerca de 200 milhões de reais por ano (SEBRAE AGRONEGÓCIOS, 2007). O território nacional reúne mais de um milhão de produtores, gerando 3,6 milhões de postos permanentes de trabalho.

Em 2002, a produção nacional de leite era em torno de 21 bilhões de litros por ano, gerando cerca de 84 bilhões de litros de efluentes, após as etapas de produção e beneficiamento, sendo que mais de 90% deste montante não recebia nenhum tipo de tratamento (SEBRAE/MG, 1997, 1998 e 2002).

Segundo o SEBRAE (1997), a maioria dos estabelecimentos produtores de leite e derivados são de pequeno porte, de origem familiar ou artesanal, e, concomitante a isso, na maioria das vezes sem registro no Serviço de Inspeção Federal. Devido a esta realidade econômica, o tratamento destes efluentes é dificultado, havendo a cobrança por providências por parte dos órgãos de fiscalização. No entanto, as alternativas de tratamento disponíveis apresentam problemas de custo e necessidade permanente de manutenção para superação de

problemas tecnológicos inerentes aos processos, o que só vem a corroborar com o não cumprimento das normas e deveres adequados para produção e descarte de rejeitos (ROSA, 2004).

A indústria de laticínios está presente, em maior ou menor escala, em todos os Estados brasileiros. A maior concentração se verifica nos estados onde a produção de leite e o consumo de laticínios são mais desenvolvidos. Assim sendo, Minas Gerais possuía em 2001, 34,16% dos estabelecimentos; São Paulo - 13,93%; Goiás - 10,16%; Paraná - 8,03%; Rio Grande do Sul - 5,95% e Rio de Janeiro - 3,52% (INDI, 2001).

Em Pernambuco, as produções de leite e seus derivados constituem um dos principais suportes econômicos nas microrregiões Vale do Ipojuca, Vale do Ipanema e Garanhuns, além de manter uma importância relativa nos pólos de produção de leite e lácteos estabelecidos na Zona da Mata, Sertão do São Francisco, Sertão do Araripe e Sertão do Pajeú. É uma atividade econômica de grande importância e em crescimento. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção subiu de 266,1 milhões de litros anuais, em 1999, para 360,2 milhões em 2001, sendo a cidade de Garanhuns responsável por 80% da produção (SEBRAE, 2007).

A atração de investimentos e o desenvolvimento das cidades do interior de Pernambuco vêm se intensificando ao longo dos anos, e uma das prioridades é o desenvolvimento da indústria láctea no Estado. De acordo com uma notícia publicada em 07/03/07, a empresa Parmalat do Brasil S.A.[®] investiu R\$ 12 milhões na modernização da fábrica localizada em Garanhuns, sendo R\$ 10 milhões utilizados em novas tecnologias e maquinário para a produção de leite e outros R\$ 2 milhões para a recuperação do núcleo de produção de iogurte, também em Garanhuns. Atualmente, Pernambuco é responsável por 1,8% da produção nacional de leite comercializado por esta empresa (PERNAMBUCO, 2007).

Investimentos do Governo incluem ainda o incentivo aos pequenos produtores de leite. Dados de 2005 revelam que a agropecuária pernambucana, onde está incluída a pecuária leiteira, representa 8% na economia estadual sendo em torno de 14 mil pequenos e médios produtores de leite em Pernambuco. O Estado possui aproximadamente 17 indústrias de derivados do leite, onde 10 estão localizadas na Região Metropolitana do Recife, que compreende os municípios de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes, e as restantes encontram-se espalhadas pelos outros municípios do Estado (PRODUÇÃO RURAL, 2005).

Todo esse crescimento, aliado às perspectivas de melhoria das questões ambientais ocasionada por uma legislação mais rígida sobre o controle de dejetos e a poluição de mananciais, indica que é possível vislumbrar que no ano de 2020 o Brasil faça parte de um

cenário perfeito para o aumento da produção leiteira, além de uma ampliação do quadro de exportação tanto do leite quanto dos produtos lácteos (SEBRAE AGRONEGÓCIOS, 2007).

1.2.3. Efluente lácteo

As indústrias de alimentos, nas quais estão inseridos os laticínios, utilizam grande quantidade de água no processo industrial, gerando águas residuárias. Estes rejeitos caracterizam-se pela elevada carga orgânica em termos de lipídios, proteínas, carboidratos e concentração de sólidos em suspensão, variando sua composição de acordo com o processamento adotado pelas empresas e a presença dos diferentes ácidos graxos de cadeia longa (MENDES, PEREIRA, CASTRO, 2006).

As indústrias de laticínios geram milhares de metros cúbicos de efluentes por dia, os quais causam sérios problemas às estações de tratamento e, de forma paralela, ao meio ambiente. Os efluentes são caracterizados pela elevada concentração de matéria orgânica, maior que a encontrada em esgotos domésticos, sendo esta originada pela presença de lactose, gorduras e proteínas oriundas do leite (PERLE, KIMCHIE, SHELEF, 1995). Segundo Carta *et al.* (1999), o tratamento desses efluentes é fundamental para enquadrá-los abaixo dos padrões de descarte vigentes devido ao seu grande impacto ambiental.

Se a planta industrial produzir insumos mais elaborados (queijo, requeijão e iogurte), os efluentes líquidos podem conter açúcar, pedaços de fruta, essências, condimentos e subprodutos como soro e leiteiro (SEBRAE/MG, 1998).

O soro, o leiteiro e o leite ácido são resíduos líquidos que não devem ser misturados aos demais efluentes da indústria, devido a sua elevada composição orgânica e seu grande valor nutritivo, com potencial de uso na fabricação de outros produtos lácteos ou na alimentação de animais (LEAL, 2000). Contudo, esta não é uma preocupação real que ocorra em pequenos laticínios. Juntamente ao efluente gerado neste tipo de indústria ainda há a presença do esgoto sanitário e o acúmulo das águas de refrigeração e das caldeiras.

Segundo Vidal (2000), os efluentes das indústrias de laticínios são geralmente produzidos de forma intermitente, e seu fluxo e características variam de uma indústria para outra dependendo dos tipos de sistemas e métodos de operação. Além disso, podem ocorrer elevadas flutuações diárias, associadas aos processos de limpeza e ao final dos ciclos produtivos. Aparentemente, os maiores contribuintes para o elevado volume de efluentes gerados são os processos de limpeza dos tanques de armazenamento. Porém há outras fontes geradoras de efluentes que são associadas ao mau funcionamento dos equipamentos e aos erros operacionais e que certamente geram rejeitos de composição indesejada e prejudiciais ao meio ambiente

(DANALEWICH, PAPAGIANNIS, BELYEA, 1998). Os fatores que determinam a carga poluidora e o volume dos efluentes líquidos gerados são os processos industriais em curso, o volume de leite processado, as condições e os tipos de equipamentos utilizados, as práticas de redução da carga poluidora e do volume de efluentes, o gerenciamento e a postura da indústria quanto às práticas de gestão ambiental e a quantidade de água na limpeza e no sistema de refrigeração (MARSHALL e HARPER, 1984).

Os efluentes lácteos contêm predominantemente leite e produtos do leite que são perdidos nos processos. A perda de leite para o efluente pode atingir de 0,5% a 2,5% do leite que entra para ser processado, podendo chegar até 3-4% deste produto. No entanto, todos os compostos são biodegradáveis, e alguns deles, como a lactose, são prontamente consumidos no tratamento biológico, enquanto as proteínas e gorduras são mais dificilmente degradadas (OMIL, GARRIDO, ARROJO, 2003).

Estudos realizados mostram a composição dos ácidos graxos derivados de triacilgliceróis provenientes da gordura e que se encontram presentes no efluente. Os componentes majoritários encontrados foram os ácidos palmítico (16 carbonos – 23,5% do total de ácidos), oléico (18 carbonos com 1 insaturação – 21,0% do total de ácidos), mirístico (14 carbonos – 10,5% do total de ácidos) e esteárico (18 carbonos – 10,0% do total de ácidos) (MULDER e WALSTRA, 1974) apud (PETRUY e LETTINGA, 1997). A presença de óleos e graxas em águas residuárias causa sérios problemas ambientais, pois estas substâncias podem formar filmes oleosos na superfície de corpos receptores, impedindo a difusão do oxigênio para a água e prejudicando o sistema local (MONGKOLTHANARUK e DHARMSTHITI, 2002).

Outros componentes de efluentes de laticínios que geram problemas são os detergentes e sanitizantes utilizados na limpeza da indústria. Os compostos mais utilizados são os limpadores alcalinos (Na_2CO_3 e NaOH), polifosfatos e agentes molhantes (alquil aril sulfonados e surfactantes de amônio quaternário). Estes são usados em pequenas quantidades, entretanto, são os que mais contribuem para a carga de DBO dos detergentes. Além de sua capacidade detergente, os sais de amônio quaternário também possuem atividade germicida e anti-séptica. Estes compostos podem contribuir para o aumento das concentrações de bases, fosfatos e ácidos, além de serem tóxicos e colaborarem para a baixa *performance* do tratamento de efluentes na indústrias de laticínios (DANALEWICH, 1998).

1.2.4. Tipos de tratamento aplicados a efluentes lácteos

Os principais impactos ambientais ocasionados pelas indústrias de laticínios estão relacionados ao lançamento dos efluentes líquidos, incluindo águas de lavagem de equipamentos

e piso, como também a geração de resíduos sólidos e emissões atmosféricas, geralmente sem nenhum controle ou tratamento. Os resíduos sólidos incluem embalagens e bombonas plásticas, embalagens de papelão, lixo doméstico, cinzas de caldeiras, e em menor quantidade, metais e vidros que podem significar perdas econômicas e agressões ao meio ambiente. Em geral, são utilizadas as grades simples como tratamento primário para remoção de sólidos grosseiros e desarenadores para remoção da areia proveniente das operações de lavagem na plataforma de recepção (MACHADO, SILVA, FREIRE, 2001). As gorduras em estado livre são retiradas através de caixas comuns de gorduras e, quando há formação de emulsão, esta deve ser quebrada pela adição de produtos químicos e utilização de flotação por ar dissolvido de modo contínuo (COUTO, MELO, MASSARANI, 2002).

No tratamento primário, é removido o material sólido em suspensão e/ou flutuante ou ainda é realizado o ajuste do pH para posterior tratamento. As principais técnicas utilizadas no tratamento primário são: Gradeamento, Sedimentação, Equalização, Neutralização (correção do pH) e Flotação. O processo de tratamento varia de acordo com a natureza do efluente e, no caso de efluentes de laticínios, além do tratamento convencional, são utilizados outros tipos de recursos físico-químicos que permitem a remoção parcial da matéria orgânica representada pelas proteínas e gorduras, através da precipitação destes compostos com substâncias químicas (coagulação-floculação) (RUSTEN, LUNDAR, EIDE, 1993). Entretanto, o uso destes reagentes possui altos custos e muitas vezes a remoção de DQO é baixa.

Dentre os processos citados, a flotação se constitui numa alternativa eficiente para o pré-tratamento de efluentes líquidos, podendo ser utilizada juntamente com outros procedimentos para o tratamento de águas residuais contendo óleos, corantes, metais pesados e gorduras.

1.2.4.1. Flotação

A flotação pode ser definida como um processo de separação sólido-líquido onde os sólidos presentes na suspensão são recuperados pela adesão dos mesmos às bolhas de gás (geralmente ar), formando um agregado bolha-partícula que ascende na fase aquosa, sendo recuperado na espuma (LUNA, 2004). Resultados obtidos por Couto *et al.* (2004) demonstraram uma eficiência de flotação acima de 90% para um efluente lácteo floculado. Li *et al.* (2007) obtiveram uma eficiência de remoção de óleo em águas residuárias de 90%, com uma separação significativa entre partículas oleosas e bolhas de gás de 96 a 97% em 5 minutos de flotação.

É uma técnica utilizada também em outros campos bem diversificados, como separação de proteínas, tratamento de líquidos provenientes de processos fotográficos, remoção de odores, separação e reciclagem de plásticos, clarificação de sucos de frutas e outros (KITCHENER, 1985).

Diferentes tipos de sistemas de flotação podem ser aplicados de forma específica a cada material a ser flotado. Uma das técnicas mais vantajosas é a utilização de colunas de flotação.

Uma coluna de flotação compreende basicamente duas regiões principais: a de coleta e a de limpeza (Figura 1.1). A região de coleta está compreendida entre o ponto de alimentação da suspensão e a entrada de ar no sistema, havendo um contato eficiente bolha-partícula tendo em vista o fluxo em contracorrente. Na região de limpeza, que se situa entre o ponto de alimentação da suspensão e a adição da água de lavagem, se encontram as partículas não flotáveis que foram arrastadas pelas bolhas. Estas são forçadas a retornar à região de coleta, sob a ação da água de lavagem. O fluxo da água de lavagem também força a suspensão alimentada a se mover descendente, evitando a contaminação do produto concentrado no topo da coluna (SANTOS, 1996).

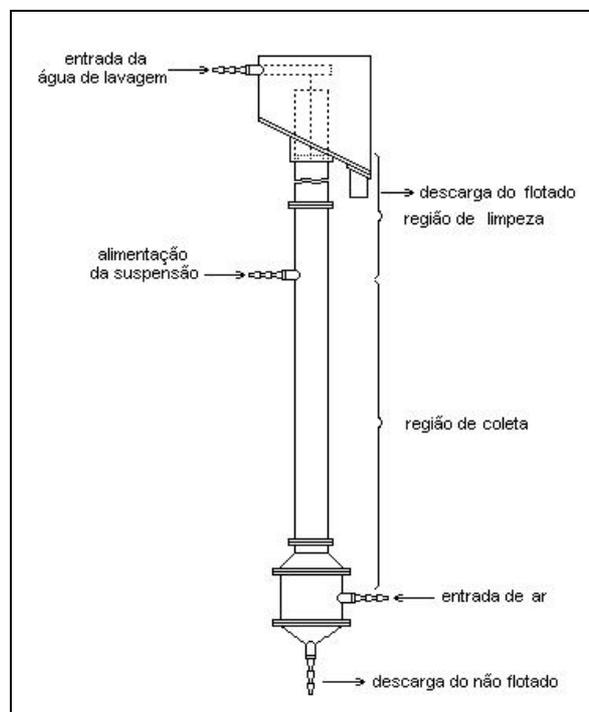


Figura 1.1 – Representação esquemática de uma coluna de flotação (LUNA, 2004)

O sistema de injeção de ar deve assegurar a distribuição homogênea das bolhas no interior da coluna e um tamanho de bolha uniforme, de forma a garantir as condições de estabilidade requeridas no processo. Usualmente, são utilizados dispersores internos, onde o ar atravessa um meio poroso.

A utilização de colunas de flotação tem se intensificado ao longo dos anos, especialmente devido a uma série de vantagens, tais como (LUNA, 2004):

- (i) forma de contato entre as fases: a suspensão escoava em contracorrente com as bolhas de ar, proporcionando um contato mais eficiente entre as bolhas e as partículas;
- (ii) a adição de água de lavagem no topo da coluna possibilita o arraste das partículas hidrofílicas para o fundo, aumentando o teor do material flotado no produto de topo;
- (iii) aumento na eficiência de remoção das espécies, especialmente devido a um melhor controle do tamanho das bolhas;
- (iv) maior facilidade de controle da operação, possibilitando a automação do processo;
- (v) capazes de flotar partículas menores pela formação de bolhas de menores tamanhos;
- (vi) menores custos de investimento e de operação;
- (vii) maior capacidade de processamento por área instalada.

1.2.4.2. Tratamento biológico

Os tratamentos biológicos são considerados os processos mais eficientes de remoção da matéria orgânica em efluentes (VIDAL, CARVALHO, MENDEZ, 2000).

As vantagens dos processos biológicos são: Menor custo quando comparados com os físico-químicos; possibilidade de mineralização da matéria orgânica presente nos efluentes; os microrganismos do processo são catalisadores autoreplicantes, ou seja, uma vez desenvolvida uma biomassa nos reatores e mantidas as condições ideais para sua sobrevivência, esta se mantém ativa por tempo indeterminado; a maioria dos reatores biológicos não requer um controle rigoroso dos parâmetros e nem mão-de-obra especializada (PAYNE, 1997).

Os sistemas biológicos podem ser aeróbios ou anaeróbios. O sistema anaeróbio é caracterizado pela ausência de oxigênio, e consiste na degradação da matéria orgânica pela ação das bactérias anaeróbias, convertendo-a a metano e compostos inorgânicos como amônia e dióxido de carbono. Este processo possui várias vantagens como: baixo consumo de energia; baixos custos de implantação, baixa produção de sólidos; produção de CH₄ (gás combustível com elevado teor calorífico); aplicabilidade em pequena e grande escala; tolerância a elevadas cargas orgânicas; baixa demanda de área; baixo consumo de nutrientes; possibilidade de preservação da biomassa sem alimentação do reator por vários meses e o lodo gerado geralmente é bem estabilizado (ROSA, 2004).

O tratamento biológico anaeróbio, apresenta problemas na presença de efluentes com elevados teores de gordura, tais como o desenvolvimento de lodos com baixa atividade, inadequadas características físicas e com elevada tendência a flotação (PERLE, KIMCHIE, SHELEF, 1995). A degradação destes lipídios é dificultada em sistemas anaeróbios devido à baixa disponibilidade para os microrganismos, uma vez que os ácidos graxos liberados podem ser compostos inibitórios nos processos anaeróbios (RINZEMA, BOONE, VAN KNIPPERNBERG (1994); OMIL, GARRIDO, ARROJO (2003). Além disso, segundo Rinzema, Boone, Van

Knippenberg. (1994), os fatores limitantes da taxa de degradação de triacilgliceróis e os processos de dissolução e de transferência de massa exercem papel fundamental no processo. Isto porque pode ocorrer 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 (PETRUY e LETTINGA, 1997).

Vidal *et al.* (2000) concluíram que a taxa de biodegradação anaeróbia de efluentes ricos em gordura é lenta devido à composição deste material. Trabalho anterior realizado por Lefebvre, Paul, Mauret (1998) afirma que a degradação biológica lenta dos lipídeos se dá também de forma limitada devido às propriedades físico-químicas das gorduras, como sua insolubilidade em água e sua solidificação ou semi-solidificação à temperatura ambiente. Além disso, a utilização de substratos insolúveis pelas células é controlada pela transferência de substrato da fase insolúvel para a célula, especialmente quando a atividade microbiana é alta. Os lipídios possuem pouca biodegradabilidade devido à sua baixa biodisponibilidade. O depósito de elevadas concentrações de gorduras na biomassa causa a queda de eficiência de sistemas de tratamento biológicos de efluentes contendo altos teores de óleos e graxas. Segundo Masse *et al.* (2003), os lipídios representam o componente limitante do tratamento no que diz respeito à remoção de sólidos em suspensão.

O processo aeróbio de tratamento de águas residuárias consiste na degradação biológica de substâncias orgânicas complexas na presença de oxigênio livre, onde parte da matéria orgânica é oxidada a produtos finais para produzir energia para processos vitais e outra parte é convertida em novas células que, na ausência de matéria orgânica, passam a metabolizar suas reservas celulares para obter energia, transformando-se nos produtos finais CO₂, H₂O e outros.

Elevadas concentrações de lipídios resultam na formação de lodos com diferentes características físicas e reduzida atividade hidrolítica devido à flotação da biomassa, aumento do tempo de retenção hidráulica desses efluentes nas lagoas de estabilização, redução da capacidade de aeradores e elevada demanda de produtos flocculantes (MENDES, FREITAS, CASTRO, 2004).

A etapa de tratamento primário pode ser associada a um tratamento hidrolítico da matéria orgânica, e este pode ser realizado pela ação de enzimas provenientes dos microrganismos presentes no efluente. Os microrganismos podem utilizar a matéria orgânica como fonte de carbono, transformando-as em substâncias químicas simples. Como nem sempre todo o substrato orgânico sofre decomposição, as técnicas mais utilizadas para estas substâncias mais resistentes são os processos biológicos, incluindo os processos de lodo ativado, filtro biológico e lagoas de estabilização aeróbias (LEAL *et.al.*, 2006).

1.2.4.3. Tratamento enzimático e uso de lipases

A utilização de enzimas em processos de descontaminação ambiental, principalmente no tratamento de efluentes, foi proposta pela primeira vez na década de 30, mas só nos anos 70 surgiu a idéia da utilização de enzimas para destruição de substâncias específicas. Comparada a processos ditos convencionais, a utilização de enzimas para tratamento de efluentes e resíduos oferece como principais vantagens a degradação de compostos tóxicos ou recalcitrantes e a operacionalidade em faixas mais amplas de concentração de contaminantes, de pH, de temperatura ou de salinidade. Outras vantagens são a ausência de produção de biomassa, a não-ocorrência de variações bruscas de carga orgânica (*shock loading*) e a ausência de período de aclimatação. Muitos estudos foram realizados nas duas últimas décadas com o objetivo de investigar novas possibilidades de utilização de enzimas em catálise ambiental. Destes, no entanto, poucos tiveram efetiva aplicação industrial porque a maior parte teve como principal objetivo estudar a remoção de compostos específicos, sem abordar os aspectos de engenharia que, em último caso, determinam a viabilidade do processo (AHUJA, FERREIRA, MOREIRA, 2004).

Dentre os processos enzimáticos que visam à redução da concentração de lipídios contidos nos efluentes com elevada carga orgânica, destacam-se os que utilizam lipases.

Impulsionadas por sua versatilidade, que permite a catálise de reações de hidrólise e de síntese, as lipases são biocatalisadores que têm muitas aplicações, razão pela qual a sua participação no mercado mundial de enzimas industriais cresce significativamente. Estima-se que, no futuro, elas terão importância industrial comparável à das peptidases, que hoje em dia representam 25 a 40% das vendas de enzimas industriais (SHARMA, CHIST, BANERJEE, 2001; HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E. C. 3.1.1.3) que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e alcoóis orgânicos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos (CASTRO, MENDES, SANTOS, 2004). As reações podem ocorrer a partir de triacilglicerídeos que possuam 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).

De acordo com Haraldsson (1991), a hidrólise de ésteres de triglicerídeos ocorre por clivagem seqüencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma, que num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis. A Figura 1.2 ilustra a hidrólise seqüencial dos grupos acila no glicerídeo catalisada por lipases.

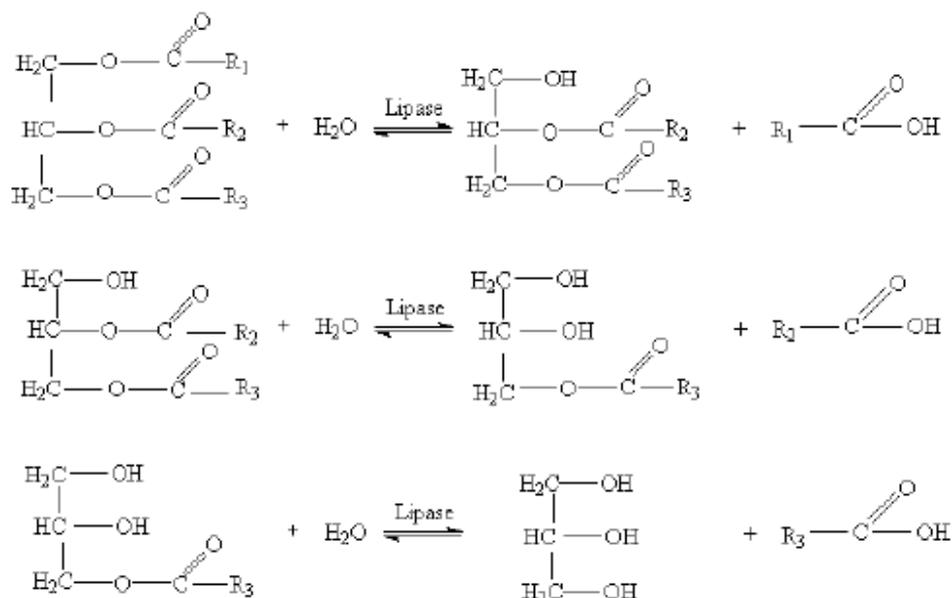


Figura 1.2 – Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo catalisada por lipases (Mendes *et al.*, 2005)

A capacidade das lipases de catalisarem tanto a hidrólise de ésteres quanto reações de esterificação, interesterificação e transesterificação, permite que estas enzimas sejam utilizadas na síntese de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas DUAN *et al.*,(1997); MARSHALL, CHOBANIAN, YANIC (2001) dando origem a produtos opticamente ativos (ésteres ou amidas) e ampliando consideravelmente as possibilidades de aplicações comerciais destas enzimas. Por isso, as lipases são excelentes alternativas para as sínteses químicas clássicas, com aplicação nas indústrias de alimentos, de detergentes, oleoquímica, farmacêutica, de química fina, de cosméticos e fragrâncias de polpa e papel, de couro, de biosensores e no tratamento de efluentes ricos em óleos e graxas (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

São enzimas comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Inicialmente, eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para o consumo humano. No entanto, em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Desta forma, os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas colocarem no mercado de lipases microbianas com atividade elevada e a um custo acessível (JEGANATHAN, NAKHLA e BASSI, 2006).

Atualmente, as pesquisas com lipases concentram-se na caracterização estrutural, no mecanismo de ação, na exploração e no aprimoramento de suas propriedades enantioesletivas,

assim como na clonagem e na expressão de genes de lipases de características interessantes em organismos de fácil cultivo em larga escala (Almeida *et al.*, 2006). Com auxílio da biofísica, da cristalografia e da modelagem molecular, cresce o grau de conhecimento sobre a estrutura e a relação estrutura-função das lipases. HAEFFNER e NORIN (1999) combinaram estudos cinéticos e de modelagem molecular para obter modelos capazes de explicar e prever a enantioseletividade das enzimas estudadas. Posteriormente, Ema (2004) descreveu as diferentes metodologias utilizadas para investigar esta propriedade específica, como o mapeamento de substratos, a mutagênese sítio-dirigida ou randômica, a análise termodinâmica e a espectroscopia de massa, dentre outras.

Indústrias como Novozymes[®], Amano[®] e Gist Brocades[®] são atualmente as maiores produtoras de lipases. Uma publicação recente sobre a disponibilidade comercial de lipases listou enzimas de trinta e quatro diferentes fontes, incluindo dezoito a partir de fungos e sete a partir de bactérias (CASTRO, MENDES, SANTOS, 2004).

Dependendo da fonte, essas enzimas podem ter massa molecular entre 20 e 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Estas enzimas são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando em sua maioria uma atividade ótima entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica.

Diversos trabalhos têm sido relatados na literatura sobre o uso de lipases para o tratamento de efluentes ricos em lipídios. Lipases provenientes de *Candida rugosa* foram utilizadas no tratamento de resíduos domésticos e na limpeza de tubulações de esgoto, fossas sépticas e sumidouros. Também foi investigada a utilização de lipases comerciais de diversas fontes (animal, vegetal e microbiana) no pré-tratamento de efluentes de matadouros (MASSÈ *et al.*, 2001) e de efluentes de restaurantes por ação de lipase bacteriana (DHARMSTHITI e KUHASUNTISUK, 1998). Essas enzimas hidrolíticas também foram utilizadas para acelerar a biodegradação de polímeros e de lamas de perfuração de poços de petróleo contendo ésteres sintéticos emulsionados em água (ALIPHAT *et al.*, 1998).

O tratamento de efluentes de laticínios foi investigado por Jung *et al.* (2002), que utilizaram lipases produzidas por *Penicillium restrictum* em um reator de lodos ativados de batelada seqüencial. Os resultados demonstraram que, para concentrações de lipídios acima de 800mg/L, a eficiência de remoção de DQO se manteve acima de 90% para o reator alimentado com o hidrolisado.

Lipases provenientes do mesmo fungo, produzidas por fermentação no estado sólido, foram empregadas no pré-tratamento enzimático de efluentes ricos em gorduras oriundos da

indústria de laticínios e de abatedouros. Elas foram aplicadas com sucesso em processos híbridos de tratamento enzimático/biológico dos tipos anaeróbico e aeróbico (CAMMAROTA, TEXEIRA, FREIRE, 2001; ROSA 2004). Em todos estes trabalhos, a obtenção das enzimas por fermentação no estado sólido proporcionou custos de produção muito inferiores aos obtidos por fermentação submersa (CASTILHO *et al.*, 2000). O baixo custo é uma premissa indispensável para emprego de enzimas no tratamento de rejeitos (CAMMAROTA e FREIRE, 2006), e o uso de consórcios microbianos produtores de enzimas seria uma alternativa interessante para este fim.

São poucos os trabalhos relatados na literatura sobre o uso de consórcios microbianos, obtidos a partir de efluentes, e que podem ser utilizados para o tratamento hidrolítico de materiais ricos em matéria orgânica. MONGKOLTHANARUK e DHARMSTHITI (2002) estudaram a obtenção de um consórcio microbiano a partir de espécies de comprovada atividade lipolítica pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Acinetobacter*. Os microrganismos foram inoculados em uma água residuária rica em lipídios sob condições controladas de temperatura, pH e agitação. Os autores obtiveram até 73% de redução de matéria orgânica no efluente após 15 dias de experimento.

Rigoni *et al.* (2003) avaliaram a eficiência da utilização de uma lipase comercial e de um *pool* enzimático na pré-hidrólise dos óleos e gorduras contidos em efluentes de frigoríficos. Foi observado que o emprego deste *pool*, por ser proveniente de um rejeito agroindustrial e por ter apresentado níveis de degradação semelhantes aos atingidos com a lipase comercial, poderia viabilizar economicamente o processo. Os autores observaram que ainda haveria a necessidade de testes de biodegradação do efluente hidrolisado para avaliar esse efeito no efluente de frigorífico.

A remoção de lipídios de efluentes gerados em restaurantes foi verificada por WAKELIN e FORSTER (1997), empregando culturas puras das espécies *Anicetobacter* sp., *Rhodococcus rubra*, *Nocardia amarae*, *Microthrix parvicella*, uma cultura mista chamada MC1 e lodo ativado aclimatado e não-aclimatado. A espécie *Anicetobacter* sp. foi a mais eficiente das culturas puras, removendo 60-65% do teor de lipídios, com uma concentração inicial de 8g/L, enquanto que a eficiência de remoção de lipídios do efluente pela cultura mista foi de 73%.

1.2.4.4. Mercado de enzimas industriais

No período de 1998 a 2005, o Brasil importou um total de 25.983 toneladas (US\$ 226 milhões) de enzimas industriais e produtos relacionados, e exportou 18.442 toneladas (US\$ 81 milhões). Os dados sobre o mercado mundial de enzimas foram obtidos do estudo *World Enzymes to 2009*, e compilados a partir de fontes primárias e secundárias, como agências governamentais de estatística, associações comerciais, embaixadas e empresas ligadas ao setor.

A indústria mundial de enzimas obteve um faturamento total de U\$3,7 bilhões em 2004, com previsão de crescimento da demanda mundial em 6,5% ao ano até 2009. Países como a China, Índia e Coréia do Sul apresentaram as maiores oportunidades de crescimento no setor. Em termos de divisão geográfica do consumo de enzimas, os Estados Unidos da América respondem a 34% do mercado, configurando-se como o maior consumidor.

O mercado das enzimas está dividido em dois grandes segmentos: enzimas industriais (enzimas técnicas, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa). Em termos percentuais, as enzimas de uso industrial representam mais de 60% do mercado mundial de enzimas. Para os próximos 10 anos, espera-se um crescimento na participação de enzimas especiais, atingindo uma proporção de 42,6% em 2014.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Utilizar lipase e/ou consórcios microbianos com atividade lipolítica visando à degradação hidrolítica dos concentrados obtidos pelo processo de flotação de efluente da indústria láctea.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização microbiológica e físico-química de um efluente lácteo industrial (soro de queijo);
- Obter um consórcio microbiano a partir de cultivo do efluente em biorreator e avaliar a cinética de crescimento celular e remoção de DQO;
- Investigar a produção de lipase por consórcio microbiano no efluente;
- Determinar as melhores condições da reação de hidrólise do material flotado por lipase/consórcio microbiano, através da utilização do planejamento experimental.

1.4 Referências

AHUJA, S. K.; FERREIRA, G. M.; MOREIRA, A. R. Utilization of enzymes for environmental applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.24, n. 2/3, p.125-154, 2004.

ALIPHAT, S.; PERIE, F.; ZURDO, C.; MARTINGNON, A. Process for enzyme pretreatment of drill cutting. Patente Nr. US 5725771, Estados Unidos, 1998.

ALMEIDA, R. V.; ALQUERES, S. M.; LARENTIS, A. L.; ROSSLE, S. C.; CARDOSO, A. M.; ALMEIDA, W. I.; BISCH, P. M.; ALVES, T. L. M.; MARTINS, O. B. Cloning, expression, partial characterization and structural modeling novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39(9),p. 1128-1136, 2006.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington DC: APHA, 1995.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20.ed., Washington: APHA, 1998. 1268 p.

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

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v.97,n.17, p.2195-2210, 2006.

CARTA, F.; ALVAREZ, P.; ROMERO, F.; PEREDA, J.; Aerobic purification of dairy wastewater in continuous regime, reactor with support - **Process Biochemistry**, v. 34, p. 613-619, 1999.

CARVALHO, P.; CAMPOS, P.; NOFFS, M.; OLIVEIRA, J.; SHIMIZU, M.; SILVA, D.; Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados, **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

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**, v.4, n.3, p.239-47, 2000.

CASTRO, H.; MENDES, A. A.; dos SANTOS, J. C.; Modificação de óleos e gorduras por biotransformação, **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

COUTO, H. J. B.; MELO, M. V.; MASSARANI, G. Treatment of milk industry effluent by dissolved air flotation - **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.21, n. 1, p. 83-91,2004.

COUTO, H. J. B.; MELO, M. V.; MASSARANI, G. Tratamento de efluentes da indústria láctea através da flotação por ar dissolvido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, 2002, São Carlos-SP, out. 9p.

DANALEWICH, J. R.; PAPAGIANNIS, T. G.; BELYEA, R. L.; Characterization of dairy waste streams, current treatment practices, and potential for biological nutrient removal - **Water Research**, v. 32, p. 3555-3568, 1998.

De FELICE, B.; PONTECORVO, G.; CARFAGNA, M., Degradation of wastewater from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida* - **Acta Biotechnologica**, n. 3, v.17, p.231-239, 1997.

DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: Biochemical properties and applications for wastewater treatment. **Journal and Microbial Biotechnology**, v.21, n.1/2, p. 75-80, 1998.

DUAN, G.; CHING, C. B.; LIN, E.; ANG, G. H. Kinetic study of enantioselective esterification of ketoprotein with n-propanol catalysed by a lipase in an organic medium. **Biotechnology Letters**, v.19, n.11, p. 1051-1055, 1997.

EMA, T. Mechanism of enantioselectivity of lipases and other synthetically useful hydrolases. **Current Organic Chemistry**, v.8, n.11, p.1009-25, 2004.

HAEFFNER, F.; NORIN, T. Molecular modeling of lipase catalysed reactions. Prediction of enantioselectivities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.47, n. 5, p.591-600, 1999.

HANSAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n. 2, p. 235-51, 2006.

HARALDSSON, G. G.; **Mar. Lipids Biotechnology**, v.7, p.337, 1991.

HAWKES, F. R.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G. K., Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater - **Water Resource**, v.29, p. 525-533, 1995.

HENZE, M., Characterization of wastewater for modeling of activated sludge process - **Water Science Technology**, v. 25, p.1, 1992.

JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHA, G. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewater using immobilized lipase hydrolyzation - **Journal of Hazardous Materials**, v. B137, p.121-128, 2006.

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

JUNG, F.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic prehydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1297-1802, 2002.

KITCHENER, J. A., The froth flotation process: Past, present and future-in brief. In: The Scientific Basis of Flotation, Part 1. NATO Advances Study Institute, p. 1-26, 1985.

LEAL, M. C. M. R., **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios**, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

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**, v.46, p. 1173-1178, 2006.

LEFEEBVRE, X.; PAUL, E.; MAURET, M., Kinetic characterization of saponified domestic lipid residues aerobic biodegradation, **Water Research**, v. 32, p. 3031-3038, 1998.

LI, Xiao-bing; LIU, Jiong-tian; WANG, Yong-tian; WANG, Cun-ying; ZHOU, Xiao-hua; Separation of oil from wastewater column flotation - **Journal of China University of Mining & Technology**, v.17, n. 4, p. 546-551, 2007.

LUNA, C. L.; **Avaliação de técnicas de separação fluido-sólido na produção de bioinseticidas a partir de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

MACHADO, R. M. G.; SILVA, P. C.; FREIRE, V. H. Controle ambiental em indústrias de laticínios - **Brasil Alimentos**, v. 7, p.34-36, março/abril, 2001.

MARSHALL, K. R.; HARPER, W. J.; The treatment of wastes from dairy industry *In*: BARNES, D. *et al.*, Food and allied industries, London: The Oitman Press, p. 296-376, 1984.

MARSHALL, J. A.; CHOBANIAN, H. R.; YANIC, M. M. Lipases-mediated resolution of 4-tms-3butyn-2-ol and use of the mesylate derivatives as a precursor to a highly stereoselective chiral allenylindium reagents. **Organic Letters**, v.3, n. 21, p.3369-3372, 2001.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v.77, n.2, p.145-55, 2001.

MASSE, L.; MASSE, D. I.; KENNEDY, K. J.; Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater, **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1365-1372, 2003.

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

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratadas por lipase – **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9,n.2, p. 143-149, abri/jun, 2006.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMISTHITI, S., Biodegradation of lipid-rich wastewater by mixed bacterial consortium - **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, p.101-105, 2002.

OMIL, F.; GARRIDO, J.M.; ARROJO, B.; Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale – **Water Research**, v. 37, p. 4099-4108, 2003.

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

PETRUY, R., LETTINGA, G., Digestion of milk-fat emulsion - **Bioresource Technology**, v.61, p. 144-149, 1997.

PEYNE, G.; Enzymes in wastewater and waste reduction, Octavo Curso Avanzado sobre Processos Biotecnologicos - **Biotecnologia Ambiental**, Cuernavaca, México, 1997.

RAUNKJAER, K.; HVITEVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. H.; Measurement of pools of protein: carbohydrate and lipid in domestic wastewater - **Water Research**, n.2, v. 8, p. 251, 1994.

RIGONI, R. E.; RIGO, E.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, D.; Di LUCCIO, M.; Utilização de lipase como auxiliar na degradação de gordura do flotado de indústria de carnes, XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis, 2003.

RINZEMA, A.; BOONE, M.; VAN KNIPPENBERG, K.; Bacterial effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion - **Water Environmental Research**, v. 66, n.1, p. 40-49, 1994.

ROSA, D. R., **Tratamento enzimático/biológico de efluente com alto teor de gordura**, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

RUSTEN, B.; LUNDAR, A.; EIDE, O.; Chemical pretreatment of dairy wastewater – **Water Science Technology**, v.28, n. 2, p. 67-76, 1993.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S.; Purification strategies for microbial lipase. **Journal Microbiology Methods**, v.52, p. 01-18, 2003.

SCALCO, A. R. e TOLEDO, J. C., 2003, A gestão da qualidade em laticínios do estado de São Paulo: situação atual e recomendações. Disponível em: <http://www.agronline.com.br>.

SHARMA, R. CHISTI,W.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n.8, p. 627-62, 2001.

VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MÉNDEZ, R.; Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewater - **Bioresource Technology**, v. 74, p. 231-239, 2000.

VON SPERLING, M; *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. V. 04 Lodos ativados, DESA/UFMG, 1997.

WAKELIN, N. G.; FORSTER, C. F.; An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. **Bioresource Technology**,. v.59, p.37-43, 1997.

BRASIL. Lei n. 9.984, de 17 de julho de 2000. Agência Nacional de Águas. **MMA**. Disponível<<http://www.ana.gov.br/Legislação/default2.asp>>. Acesso em 23 mai. 2007.

BRASIL.Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 357, 17 mar. 2005. Disponível<<http://www.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegiyipo=3&ano=2005>>. Acesso em 23. mai. 2007.

BRASIL. Lei n. 6.938, de 31 de agosto de 1981. IBAMA. **MMA**. Disponível<http://www.silex.com.br/leis/l_6938.html>. Acesso em 23 mai. 2007.

Disponível<<http://www.pe.sebrae.com.br:8080/notitia/servlet/newstorm.notitia.presentation.NavigationServlet?publicationCode=1&pageCode=259&textCode=3548&date=currentDate>> Acesso em Mai. 2007.

Disponível<http://www.pe.gov.br/gabinete_civil/news1_.asp?idnoticia=306&argumento=leite> Acesso em Mai. 2007.

Disponível<<http://www.producaorural.pe.gov.br/noticias.asp?noticia=482>> Acesso em Mai. 2007.

Disponível em: <<http://www.pe.sebrae.com.br/>>. Acesso em: 31 mai. 2008.

CAPÍTULO 2

Caracterizações microbiológica e físico-química de efluente lácteo visando à obtenção de consórcio microbiano

Micheline Oliveira de Menezes Belo; Caroline Correia Guirelli; Alexandra Amorim Salgueiro;
Christine Lamenha Luna-Finkler*

Universidade Católica de Pernambuco; Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, 50050-900
Recife, PE; Brasil.

E-mail: chrislluna@yahoo.com.br

* Autor para correspondência.

RESUMO

Neste trabalho, um efluente lácteo industrial foi caracterizado em termos microbiológicos e físico-químicos e utilizado para a obtenção de um consórcio de microrganismos visando a sua biodegradação. Para a caracterização microbiológica foram determinadas a contagem padrão de bactérias heterotróficas e as contagens de fungos filamentosos e leveduras de acordo com as metodologias oficiais. A caracterização físico-química foi realizada em termos do teor de proteínas, cinzas, lipídios, carboidratos, pH e demanda química de oxigênio (DQO). O consórcio microbiano foi obtido em biorreator operando em batelada e contendo 1,5L do efluente, a 200rpm, aeração de 1vvm e temperatura de 28 - 30°C. Os cultivos foram realizados em duplicata durante onze dias, sendo realizado um pulso de 150mL do efluente (10% do volume útil do biorreator) no sétimo dia do cultivo, sendo determinada a cinética de crescimento celular, concentração de DQO e atividade lipolítica. Foram obtidas concentrações iniciais de 3×10^9 UFC/mL e 8×10^4 UFC/mL para contagem total de bactérias e de fungos e leveduras, respectivamente. O efluente apresentou uma DQO inicial de 64.000mgO₂/L, pH 5,0, e concentrações correspondentes a 5% de carboidratos, 0,8% de proteínas e 0,6% de lipídios. Os cultivos do efluente no biorreator demonstraram um aumento da concentração de bactérias ao longo do tempo, atingindo 1×10^{13} UFC/mL após oito dias, enquanto que as concentrações de fungos filamentosos e de leveduras foram inibidas. Foi observada uma redução da DQO de 47 a 63,5% após 11 dias de cultivo, demonstrando a potencialidade da utilização do consórcio microbiano no tratamento do efluente. Ensaio qualitativos demonstraram a presença das enzimas lipase, amilase, protease e celulase no extrato metabólito do consórcio microbiano. No entanto, foram obtidos baixos valores de atividade lipolítica quando comparados com a atividade da enzima comercial, sendo observado ainda que a atividade decresce ao longo do tempo.

Palavras-chave: efluente lácteo, caracterização microbiológica, caracterização físico-química, consórcio microbiano, lipase; hidrólise.

ABSTRACT

In this work, a dairy effluent was characterized in terms microbiological and physical-chemical and used to obtain a microbial consortium. Microbiological characterization was performed by total heterotrophic bacteria, filamentous fungi and yeasts count according to the official methodologies. Physical-chemical characterization was accomplished by content of protein, ash, lipids, carbohydrates, pH and chemical oxygen demand (COD). Microbial consortium was obtained in batch using a bioreactor containing 1,5L of dairy effluent, at 200 rpm, 1vvm, at 28 - 30°C. Cultivations were performed in duplicate for eleven days, being applied a pulse of 10% (v/v) of effluent on the seventh day of the experiment. Cellular growth kinetics, chemical oxygen demand concentration and lipolytic activity were determined. Initial concentrations of bacteria and fungi and yeasts were equal to 3×10^9 CFU/mL and 8×10^4 CFU/mL, respectively. Effluent presented a COD of 64.000mgO₂/L, pH 5,0 and concentrations of 5% of carbohydrates, 0,8% of protein and 0,6% of lipids. Cultivations showed an increase on the bacteria concentration, reaching 1×10^{13} CFU/mL after eight days, while filamentous fungi and yeast concentrations were inhibited. An reduction of COD concentration in the range of 47 to 63,5% was observed after eleven days of cultivation, demonstrating the potentiality of use of microbial consortium for effluent treatment. Qualitative assays showed the presence of the enzymes: lipase, amylase, protease and cellulase in the metabolic extract of the microbial consortium. However, low values of lipolytic activity were obtained as compared to the commercial enzyme, being observed that activity decrease along time.

Keywords: *dairy effluent, microbiological characterization, physical-chemical characterization, microbial consortium, lipase, hydrolysis.*

2.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos capazes de minimizar os problemas ocasionados por muitos efluentes industriais é um desafio da biotecnologia ambiental. Um dos principais problemas encontrados é o tratamento de efluentes contendo elevados teores de lipídios, tais como os originados da indústria de laticínios.

Raunkjaer *et al.* (1994) e JAGANATHAN, BASSI, NAKHA (2006) relataram que os lipídios, juntamente com proteínas e carboidratos, compõem os principais compostos orgânicos de águas residuárias de diversas indústrias de alimentos e até mesmo da indústria de ração animal, sendo esta uma das maiores produtoras de efluentes ricos em óleos e gorduras. Esses compostos causam grandes danos ao meio ambiente, como a formação de filmes de óleos nas superfícies aquáticas que dificultam a dispersão de luz e a conseqüente difusão de oxigênio para o meio, causando danos à biota local, conforme descrito por MONGKOLTHANARUK e DHARMISTHITI (2002). As principais fontes de geração de lipídios são indústrias de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, curtumes, matadouros e os efluentes domésticos e de restaurantes.

De acordo com MENDES, CASTRO, PEREIRA, (2005), a concentração de lipídios em efluentes lácteos atinge valores em torno de 4.680mg/L. Glazer e Nikaido (1995) relataram que a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) para efluentes de laticínios sem recuperação do soro de queijo varia de 40.000 a 48.000mg/L, superior aos valores encontrados para efluentes de alimentos enlatados e de cervejarias (500-2.000mg/L), efluentes de processamento de óleo comestível, vinhaça e chorume (15.000-20.000mg/L) e efluente de matadouros (30.000mg/L).

Em sistemas de tratamento biológico, o elevado teor de lipídios dificulta a sedimentação do lodo, demanda maior tempo de retenção e aeração, além de dificultar a operação do reator de digestão anaeróbia (UASB) devido à formação de caminhos preferenciais no leito de lodo e arraste da biomassa, levando à perda da eficiência e até mesmo ao colapso do reator (Leal, (2000); HU, THAYANITHY, FOSTER (2002). Em sistemas de tratamento físico-químico, é necessária uma maior quantidade de produtos flocculantes com significativo aumento na geração do lodo (LIE e MOLIN, 1991). De acordo com Cammarota e Freire (2006), a aplicação de um processo de pré-tratamento para hidrólise de gorduras pode melhorar a degradação biológica de efluentes gordurosos, acelerando o processo e reduzindo o tempo de tratamento.

Segundo Rajeahwari *et. al* (2000), no tratamento de efluentes gordurosos, os lipídios representam em torno de 50% da DQO do resíduo. A utilização de enzimas pode ser de grande interesse no tratamento destes efluentes. No entanto, o elevado custo das enzimas comerciais disponíveis muitas vezes inviabiliza o processo, e a utilização de consórcios microbianos com atividade enzimática, obtidos a partir do próprio efluente, torna-se uma alternativa promissora no

tratamento eficiente destes resíduos. Em trabalho realizado por Mongkolthanaruk e Dharmstithi (2002), foi demonstrado que as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*-LP602, *Bacillus* sp.-B304 e *Acinetobacter calcoaceticus*-LP009 são eficientes na redução de DBO e do conteúdo de lipídios, provavelmente devido à produção de lipases. Masse, Kennedy, Chou (2001) descreveram que este tipo de tratamento apresenta algumas vantagens, tais como a não-geração de produtos tóxicos, condições moderadas de operação e redução de custo em termos de energia, tornando o processo atrativo do ponto de vista econômico e ambiental.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar um efluente lácteo industrial em termos microbiológicos e físico-químicos e a obtenção de um consórcio de microrganismos com potencial atividade enzimática para a biodegradação deste efluente. Os resultados visam contribuir para o desenvolvimento de tecnologia de tratamento hidrolítico de águas residuárias da indústria láctea e de efluentes ricos em lipídios.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Coleta e acondicionamento do efluente

A empresa fornecedora do efluente está localizada no município de São Bento do Una/PE e caracteriza-se como uma microempresa de caráter familiar, produtora de quatro diferentes tipos de queijo (coalho, muzzarella, ricota e manteiga), com produção média diária de 500kg, 300kg, 100kg e 200kg, respectivamente. A empresa também é produtora de outros derivados, como requeijão, doce de leite, manteiga e bebidas lácteas de vários sabores.

Foram coletados 50L do efluente, proveniente do processo industrial da fabricação do queijo de coalho, sem qualquer tipo de tratamento prévio, sendo a amostra transportada sob refrigeração em recipientes de polietileno com capacidade volumétrica de 20L. Uma amostra estéril de 250mL foi coletada de acordo com os padrões estipulados pela APHA (1992), visando a caracterização microbiológica do efluente.

As amostras foram homogeneizadas, distribuídas em garrafas plásticas limpas e não estéreis de 2L de capacidade e congeladas à temperatura de -20°C no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco.

2.2.2. Caracterização microbiológica

A contagem de bactérias heterotróficas foi realizada utilizando o meio de cultura para contagem padrão, que apresenta a seguinte composição (g/L): triptona 5g; extrato de levedura

2,5g; glicose 1g; Agar 15 g; pH 7,0. As amostras foram diluídas utilizando-se água tamponada sendo empregada a técnica “pour plate”, com incubação das amostras a 35°C por 48h (APHA, 1992). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A contagem de fungos e leveduras foi realizada utilizando meio de cultura (g/L): extrato de malte 30 g; peptona 5 g; cloranfenicol 0,1 g; Agar 15 g; pH 5,4. Após diluição da amostra, um volume de 0,1 mL foi inoculado em placas de Petri e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski. As amostras foram incubadas a 20°C por 2 dias para a contagem de leveduras e por 5 – 7 dias para os fungos filamentosos (APHA, 1992). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2.3. Caracterização físico-química

O efluente foi caracterizado em termos do teor de proteínas, cinzas, lipídios e carboidratos, sendo a análise realizada através do método Adolfo Lutz (2005) no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAL) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi determinada de acordo com metodologia da APHA (1992) pelo método de refluxo fechado utilizando a solução digestora de dicromato de potássio como oxidante. As análises foram realizadas em triplicata.

A determinação do pH foi realizada através da leitura instrumental de um pHmetro digital (ORION, modelo 20A). Após a calibração com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0, o eletrodo de vidro foi imerso em um béquer com aproximadamente 50mL da amostra, fornecendo diretamente o resultado através do mostrador digital.

2.2.4. Obtenção do consórcio microbiano

O consórcio microbiano foi obtido a partir de cultivo do efluente em biorreator de 2L de capacidade e 1,5L de volume útil, operando sob agitação mecânica de 200rpm, aeração de 1vvm e temperatura de 28 - 30°C (Figura 2.1). Os cultivos foram realizados em duplicata.

Cada reator permaneceu em funcionamento durante onze dias, sendo realizado um pulso corresponde a 10% (v/v) do volume do biorreator no sétimo dia de experimento. A adição do efluente bruto após o crescimento dos microrganismos visa investigar a eficácia do consórcio microbiano em degradar a matéria orgânica para possível aplicação como inóculo em tratamento biológico do efluente. Foram retiradas amostras em duplicata de aproximadamente 10mL, sendo

armazenadas em freezers para posterior análise da cinética de crescimento celular, determinação da DQO, avaliação qualitativa de atividades enzimáticas e atividade lipásica.



Figura 2.1 - Biorreator contendo efluente lácteo para obtenção do consórcio microbiano

2.2.5. Avaliação qualitativa da atividade enzimática

As atividades enzimáticas das amostras coletadas no reator foram determinadas por meio do método de difusão em Agar, baseado na metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), sendo investigadas as enzimas: celulasas, amilases, proteases e lipases.

O meio de cultura para determinação de celulasas apresentou a seguinte composição, em (g/L): KCl 3,8g; K_2HPO_4 2,0g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1g; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0g; extrato de malte 0,5g; carboximetilcelulose 10,0g; Agar 15,0g; pH 7,0. O meio de cultura para determinação de amilases foi o Agar nutritivo (AN), de composição em (g/L): peptona 5,0g; extrato de carne 3,0g; Agar 15,0g; contendo amido 2,0g a pH 7,3, enquanto que o meio de cultura para determinação de proteases foi o AN, contendo gelatina a 8%(p/v). O meio de cultura para determinação de lipases foi de composição, em (g/L): peptona 10,0g; NaCl 5,0g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1g; Agar 15,0g; tween-20 10mL; pH 6,0. As atividades enzimáticas foram expressas de forma qualitativa, indicando-se a ausência de atividade (-) e teste positivo cuja intensidade de atividade foi proporcional ao número de (+).

2.2.6. Atividade lipásica

A atividade lipásica foi avaliada de acordo com Vorderwulbecke, Kieslich, Erdmann (1992), utilizando o lipídio paranitrofenilpalmitato (pNPP) que, por hidrólise, produz ácido palmítico e um derivado de coloração amarela. Este é espectrofotometricamente determinado avaliando-se a coloração formada por unidade de tempo. As velocidades máximas das reações enzimáticas foram calculadas em função das leituras de absorbâncias medidas a 410nm, sendo determinadas as atividades lipásicas utilizando-se o coeficiente de absorção molar do pNPP ($15\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Para realização das análises as amostras coletadas no biorreator foram centrifugadas a 4000rpm durante 10min (extrato bruto), sendo as análises realizadas em triplicata. As medidas foram realizadas a cada 2 minutos em espectrofotômetro (Libra S32-Biochrom), por um total de 10min. Os resultados foram comparados com a atividade lipásica de uma lipase comercial (lipolase), obtida da Novozymes®. A Unidade Internacional (UI) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que catalisa $1\mu\text{mol}$ de substrato por minuto nas condições da reação (pH 8,0; 28°C). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 2.2 e 2.3 mostram os resultados de contagem de bactérias heterotróficas e de fungos e leveduras, respectivamente, durante os cultivos do efluente no biorreator. Foi observado um aumento da concentração de bactérias ao longo do tempo, atingindo cerca de 1×10^{13} UFC/mL após oito dias, enquanto que a população de fungos e leveduras foi inibida. Elevados valores iniciais de concentração de células foram observados, sendo de 3×10^9 UFC/mL para bactérias heterotróficas e de 8×10^4 UFC/mL para fungos e leveduras.

A elevada concentração microbiana no efluente bruto sugere que este pode apresentar grande potencial biotecnológico considerando a possibilidade de obtenção de um consórcio microbiano com atividade enzimática. Por outro lado, a caracterização microbiológica relativa à quantificação do número total de bactérias, leveduras e fungos filamentosos demonstrou que o processo industrial possivelmente não se encontra adequado sob o ponto de vista higiênico-sanitário, tendo em vista o alto número de microrganismos determinados no efluente.

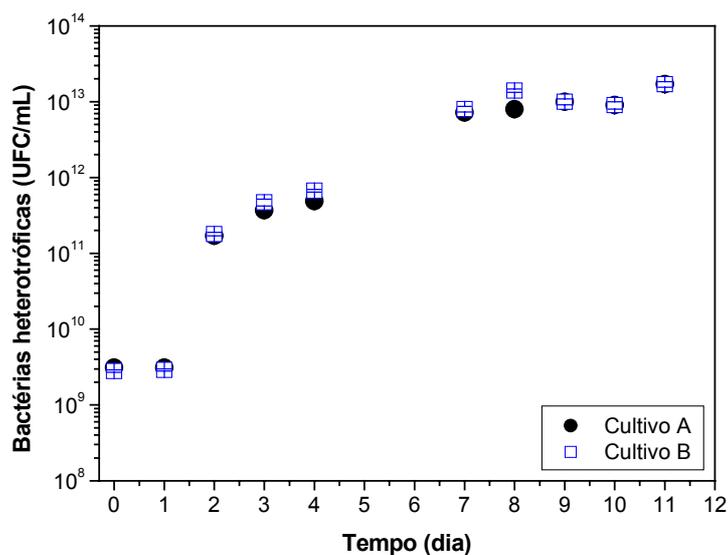


Figura 2.2 - Resultados de contagem de bactérias heterotróficas durante cultivo do efluente lácteo em biorreator (200rpm, 1vvm, 28-30°C)

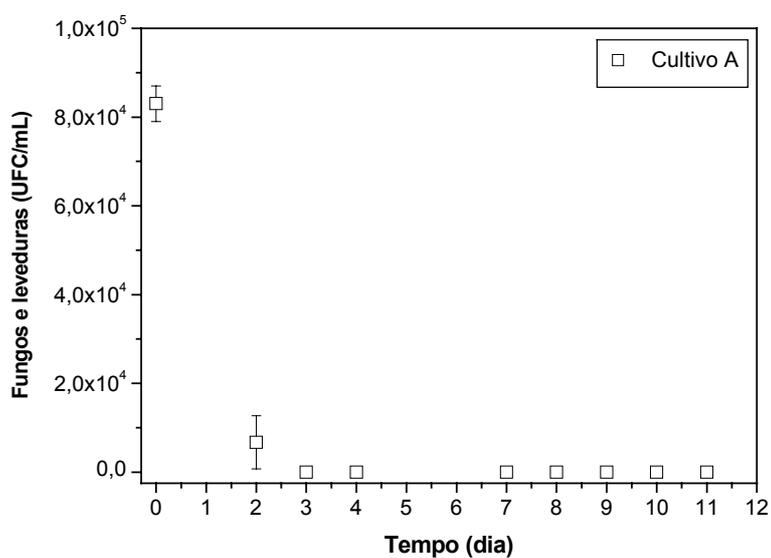


Figura 2.3 - Resultados de contagem de fungos e leveduras durante cultivo do efluente lácteo em biorreator (200rpm, 1vvm, 28-30°C)

Os resultados referentes à caracterização físico-química do efluente são mostrados na Tabela 2.1. Pode ser observado que a concentração total de matéria orgânica presente, incluindo proteínas, lipídios e carboidratos, foi equivalente a 5,98g/100g. O alto valor nutritivo desse

efluente está representado pela proporção de 1:6 entre a fonte de nitrogênio constituída pelas proteínas e a fonte de carbono, formada por carboidratos mais lipídios. Estes resultados indicam que o efluente lácteo pode favorecer o cultivo de grande número de microrganismos, como descrito por Nitschke, Rodrigues, Schinatto (2001) para *Xanthomonas campestris*, por Silva (2006) para *Bacillus* sp. e por Podlech *et al.* (1991) para *Lactobacillus*, quando utilizaram soro de leite na composição de meios de cultivo.

Tabela 2.1 - Caracterização físico-química do soro de queijo

Características	Valor
Umidade e substâncias voláteis (g/100g)	93,45
Proteínas (g/100g)	0,83
Cinzas (g/100g)	0,57
Lipídios (g/100g)	0,60
Carboidratos (g/100g)	4,55
DQO (mg O ₂ /L)	64.000
pH	5,0

Os valores referentes às concentrações de proteínas, lipídios e DQO obtidos no presente trabalho foram superiores aos reportados na literatura. Lyberatos, Gavala, Stamatematou (1997) obtiveram uma concentração de proteínas de 0,63g/100mL e uma DQO de 60.271mg O₂/L em efluentes de laticínios. Em trabalho realizado por Mendes, Pereira, Castro (2006), foi caracterizado um efluente bruto colhido à jusante da descarga de uma indústria de laticínios com volume de descarte numa vazão de 110 m³/dia, sendo obtidos valores de 0,57g/100mL para proteínas, 0,47g/100mL para lipídios, DQO de 52.500mg O₂/L e pH do efluente de 5,25. Os mesmos autores descrevem que os principais ácidos graxos de cadeia longa presentes no efluente foram o palmítico, em maior concentração, seguido do oléico, esteárico e mirístico.

A Resolução N^o 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA, estabelece que o efluente industrial, ao ser incorporado a um corpo hídrico, não poderá alterar a qualidade da água do corpo hídrico receptor (Brasil, 2005). Os elevados valores observados para as concentrações de microrganismos e de DQO no efluente em estudo indicam a necessidade de implementação de um sistema de tratamento de efluentes de forma a tender às exigências ambientais e da legislação. Além disso, o tratamento de efluentes na produção de alimentos tem o objetivo não somente de minimizar a poluição ambiental, como de prevenir a contaminação do alimento durante o processo produtivo.

O principal parâmetro para avaliar se um tratamento foi eficiente ou não é a remoção de matéria orgânica, que neste trabalho foi quantificada em termos de DQO. De acordo com a Figura 2.4, pode ser observado que os valores de DQO decrescem ao longo do tempo de cultivo, atingindo valores entre 22.000 e 32.000mg O₂/L após 11 dias, sendo equivalente a uma redução

entre 47,0 a 63,5%. Em trabalho realizado por Dors *et al.* (2007), foi obtida uma remoção de DQO de 31% para um efluente de uma indústria frigorífica de abate de frango, enquanto que com o uso de lipases pancreáticas em concentrações variando de 0,1 a 0,35%, os índices de remoção de DQO variaram de 88 a 95%.

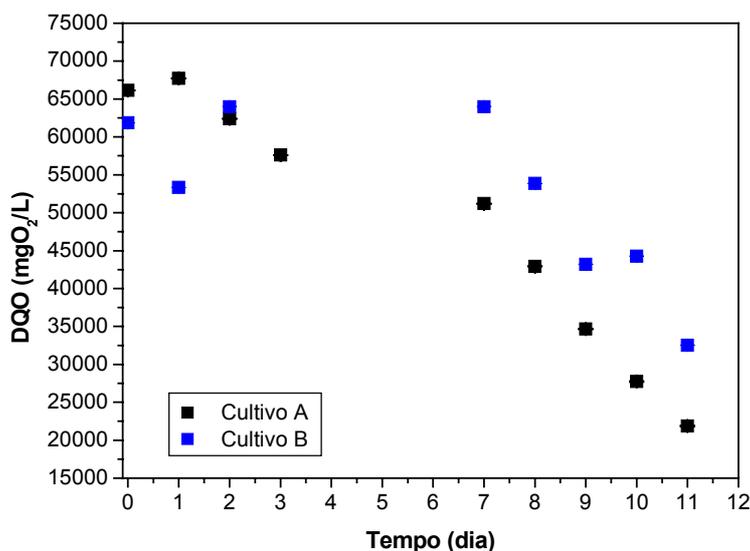


Figura 2.4 - Demanda Química de Oxigênio (DQO) durante o cultivo do efluente lácteo em biorreator (250 rpm, 1vvm, 30°C).

A Tabela 2.2 ilustra os resultados de avaliação qualitativa da atividade enzimática. Todas as atividades aumentaram proporcionalmente aos dias de cultivo do consórcio microbiano. As atividades de amilases, celulasas, lipases e proteases determinadas no cultivo submerso do efluente lácteo durante a obtenção do consórcio microbiano podem representar um potencial enzimático para a biodegradação do elevado conteúdo de matéria orgânica presente nesse efluente.

Com o objetivo de avaliar a potencialidade da produção de lipases pelo consórcio microbiano, a atividade lipásica das amostras foi quantificada ao longo do cultivo no biorreator e os resultados estão apresentados na Figura 2.5. Foram obtidos baixos valores de atividade lipásica quando comparados com a atividade da enzima comercial (2.124 ± 190 UI/mL), sendo observado ainda que a atividade decresce ao longo do tempo.

Tabela 2.2 - Resultados de atividades enzimáticas das amostras do consórcio microbiano obtido a partir do cultivo em soro de queijo

Tempo (dia)	Amilase	Celulase	Lipase	Protease
0	++	-	-	-
1	++	-	-	+
2	++	+	+	++
3	++	+	+	+++
4	+++	+	++	+++
7	+++	++	++	+++
8	+++	+++	+++	+++
9	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++
11	+++	+++	+++	+++

Ausência de atividade (-)

Teste positivo cuja intensidade de atividade foi proporcional ao número de (+).

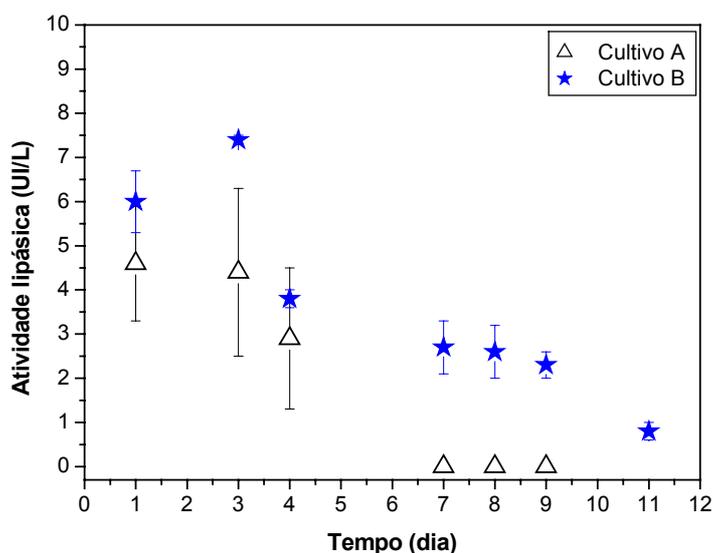


Figura 2.5 – Resultados de atividade lipásica durante cultivo do efluente lácteo em biorreator (250rpm, 1vvm, 30°C).

Tendo em vista a redução da DQO observada, a hidrólise da matéria orgânica contida no efluente pode ser creditada à presença de outras enzimas, como proteases e amilases, considerando que os efluentes das indústrias de derivados lácteos contêm, além de lipídios, altos teores de proteínas provenientes do leite (caseína) e de carboidratos.

2.4. CONCLUSÕES

O efluente lácteo estudado no presente trabalho apresentou um elevado teor de DQO quando comparado com a literatura, e suas características físico-químicas favorecem a obtenção de um consórcio microbiano sob condições aeróbias. Os resultados demonstram que o consórcio obtido apresenta atividade enzimática, embora a atividade lipásica tenha sido muito inferior quando comparada com a atividade de uma enzima comercial.

A redução da DQO do efluente demonstra a potencialidade da utilização do consórcio microbiano visando o tratamento do efluente lácteo, salientando-se a necessidade de estudos posteriores para a avaliação da eficiência do consórcio sob condições otimizadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro (número de processo 485292/2006-8) e concessão de bolsa de Iniciação Científica, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado, e à empresa Laticínios São Bento, pela doação do soro de leite.

2.5. REFERÊNCIAS

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for Water and Wastewater*. 18. ed., Washington: APHA, 1992.

BRASIL. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357/2005. www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf. 02 Abril 2008.

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

DORS, G.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; JÚNIOR, A.F., Hidrólise Enzimática e Biodegradação Simultâneas no Tratamento de Águas Residuárias Ricas em Lipídeos, XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, Curitiba, 2007.

GLAZER, A. N.; NIKAIIDO, H. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. New York: W. H. Freeman & Company, 1995.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S. G., The use of solid media detection of enzyme production by fungi. **Mycological Society of America**, v.67, p.597-607,1975

HU, W.C.; THAYANITHY, J.B.; FOSTER, C.F. A kinetic study of the anaerobic digestion of ice-cream wastewater. **Process Biochemistry**, v.37, p. 965-971, 2002.

JEGANATHAN, J.; BASSI, A. & NAKHA, G., **Journal of Hazardous Materials**, B137, p.121-128. 2006

LEAL, M.C.M.R. **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

LIE, E.; MOLIN, G. Conversion of low grade fats by biological means. In: Martin, A. M. (Ed.) *Bioconversion of waste materials to industrial products*. New York: Elsevier Applied Science, 1991.

LYBERATOS, G.; GAVALA, H.N.; STAMATELATOU, A. An integrated approach for management of agricultural industries wastewater. **Nonlinear Anal-Theor.**, v. 30, p. 2341-2351, 1997.

MASSE, L.; KENNEDY, K.J. & CHOU, S., Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v.77, p.145-155, 2001

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**, v. 28, p. 296-305, 2005.

MENDES, A.A.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F. Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratadas por lipases. **Brazilian. Journal of Food Technology.**, v.9, p. 143-149, 2006.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 50, p.101-105, 2002.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V. & SCHINATTO, L.F., Formulação de meios de cultivo a base de soro de leite para produção de goma xantana por *Campestris* C7L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21,p. 82-85, 2001.

NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ, (2005), *Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos*, 4th ed., São Paulo.

PODLECH, P.A.S.; LUNA, M.F.; JERKE, P.R.; SOUZA, O.; SOUZA NETO, C.A.C.; Semicontinuos fermentation of whey by *Lactobacillus bulgaris* I. Experimental results. **Biotechnology Letters**, v.12, p. 531-534, 2001

RAJESHWARI, K.V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K. & KISHORE, V.V.N., Anaerobic digestion technologies for energy recovery from industrial wastewater – a study in indian context. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.4, p.135-156, 2000

RAUNKJAER, K.; HVITEVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. H. Measurement of pools of protein: carbohydrate and lipid in domestic wastewater. **Water Resource.**, v. 8, p. 251-262, 1994.

SILVA, C.R. (2006), **Otimização do meio de cultura a base de soro de leite e água de maceração de milho para produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2**, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, RJ.

VORDERWULBECKE, T.; KIESLICH, K.; ERDMANN, H. Comparison of lipases by different assays. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 631-639, 1992.

CAPÍTULO 3

Degradação hidrolítica de material flotado de efluente lácteo industrial

Micheline Oliveira de Menezes Belo; Alexandra Amorim Salgueiro;
Christine Lamenha Luna-Finkler*

Universidade Católica de Pernambuco; Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, 50050-900 - Recife, PE;
Brasil.

E-mail: chrislluna@yahoo.com.br

* Autor para correspondência.

RESUMO

Os elevados teores de lipídios presentes em efluentes de laticínios podem afetar o desempenho do tratamento biológico, e a hidrólise enzimática pode vir a contribuir para o aumento da biodegradação de efluentes gordurosos, aumentando a eficiência dos processos de tratamento biológico. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática de material flotado, obtido a partir do processo de flotação em coluna de efluente lácteo industrial (soro de queijo), utilizando a técnica de planejamento de experimentos. Inicialmente, foi avaliado o desempenho de uma lipase comercial (lipolase®), sendo investigados os efeitos da agitação e da concentração de enzima sobre a hidrólise. Foi realizada a análise estatística considerando-se os efeitos significativos a um nível de confiança de 95%, sendo verificado que concentrações maiores de enzima dentro da faixa investigada (1 a 7%) maximizam a hidrólise de óleos e gorduras do material flotado, bem como para níveis de agitação entre 100 e 150rpm. Em todos os experimentos houve a liberação de ácidos graxos no meio em percentuais próximos a 100% apenas após 4 horas de reação. Vale salientar ainda que percentuais de liberação de ácidos graxos superiores a 92% foram obtidos para toda a faixa de concentração testada. Uma agitação de 150rpm foi utilizada em um segundo planejamento experimental, avaliando-se a concentração da enzima comercial associada a um consórcio microbiano. O acompanhamento cinético do processo mostrou que a adição do consórcio não influenciou de maneira positiva o aumento do teor de ácidos graxos livres no meio. Ensaio adicionais são ainda necessários para avaliar o efeito da adição da enzima em menores concentrações sobre a hidrólise do material flotado de efluente de laticínios.

Palavras-chave: hidrólise, efluente lácteo, flotado, lipase, consórcio microbiano.

ABSTRACT

The high levels of lipids in the dairy effluents can affect the performance of biological treatment, and enzymatic hydrolysis could contribute to increased degradation of fatty waste, increasing the efficiency of biological treatment. In this context, the objective of this study was evaluating enzymatic hydrolysis of floated material, obtained from the column flotation using a dairy industry using the technique of experimental design. Initially, performance was evaluated by a commercial lipase (lipolase®), being investigated the effects of agitation and enzyme concentration on hydrolysis. A statistical analysis was performed considering the significance of effects to a confidence level of 95%. Higher enzyme concentrations in the range investigated (1 to 7%) maximize the hydrolysis of oils and fats in the floated material, and to agitation levels between 100 and 150rpm. In all experiments, fatty acids were released in rates near to 100% only after 4 hours of reaction. Moreover, rates of released fatty acids were greater than 92% in all the concentration range tested. An agitation of 150rpm was used in a second experimental design, evaluating the concentration of commercial enzyme associated with a microbial consortium. The kinetic monitoring of the process showed that the addition of the consortium did not influence in a positive manner the increase the content of free fatty acids. Additional tests are needed to evaluate the effect of the enzyme addition at lower concentrations on the hydrolysis of floated material from the dairy effluent.

Keywords: *hydrolysis, dairy effluent, floated, lipase, microbial consortium.*

3.1. INTRODUÇÃO

Os efluentes gerados pelas indústrias de laticínios são caracterizados por uma elevada concentração de matéria orgânica, principalmente no que diz respeito aos lipídios, o que dificulta as formas de tratamento que visam diminuir a sua carga poluidora antes de serem lançados nos corpos hídricos receptores.

Inicialmente, o tratamento de efluentes líquidos industriais contendo sólidos em suspensão (como é o caso dos efluentes lácteos) é realizado pelo emprego de métodos primários de tratamento com o objetivo de remover o material sólido em suspensão e/ou flutuante. Dentre as principais técnicas utilizadas no tratamento primário destaca-se a flotação.

A flotação surge como uma alternativa eficiente para o pré-tratamento de efluentes líquidos, podendo ser utilizada juntamente com outros procedimentos para o tratamento de águas residuais contendo óleos, corantes, metais pesados e gorduras (LUNA, 2004). Encontra aplicação na separação de proteínas, tratamento de líquidos provenientes de processos fotográficos, remoção de odores, separação e reciclagem de plásticos, clarificação de sucos de frutas e outras (KITCHENER, 1985).

A etapa de tratamento primário por flotação gera um material flotado que possui uma característica sólida ou semi-sólida, e o tratamento deste resíduo pode ser realizado por hidrólise pela ação de enzimas comercialmente disponíveis ou provenientes dos microrganismos presentes no efluente. Os microrganismos podem utilizar a matéria orgânica como fonte de carbono, transformando-as em substâncias químicas simples. (KITCHENER, 1985).

O uso de enzimas comerciais também pode ser empregado, no entanto, apresenta um custo elevado.

O pré-tratamento enzimático apresenta algumas vantagens, tais como o controle dos produtos, condições moderadas de operação, redução de custo em termos de energia e de equipamentos, tornando este processo atrativo sob o ponto de vista ambiental (MASSE, KENNEDY, CHOU 2001). A aplicação de lipases é particularmente importante devido ao fato da hidrólise ser específica em óleos e graxas, o que representa grande interesse para diferentes aplicações industriais (LEAL *et al.*, 2006).

Ringoni *et al.* (2003) avaliaram a eficiência da utilização de uma lipase comercial e de um *pool* enzimático na pré-hidrólise dos óleos e gorduras contidos em efluentes de frigoríficos. Foi observado que o emprego deste *pool*, por ser proveniente de um rejeito agroindustrial e por ter apresentado níveis de degradação semelhantes aos atingidos com a lipase comercial, poderia viabilizar economicamente o processo. Os autores observaram que ainda haveria a necessidade

de testes de biodegradação do efluente hidrolisado para se avaliar esse efeito no efluente de frigorífico.

São poucos os trabalhos relatados na literatura sobre o uso de consórcios microbianos, obtidos a partir de efluentes, e que podem ser utilizados para o tratamento hidrolítico de materiais ricos em matéria orgânica. Mongkolthanaruk e Dharmsthiti (2002) estudaram a obtenção de um consórcio microbiano a partir de espécies de comprovada atividade lipolítica pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Acinetobacter*, e inocularam estes microrganismos em uma água residuária rica em lipídios sob condições controladas de temperatura, pH e agitação. Os autores obtiveram até 73% de redução de matéria orgânica no efluente após 15 dias de experimento.

O objetivo do presente trabalho é avaliar a hidrólise de material flotado proveniente de um processo de flotação em coluna utilizando uma lipase comercial (lipolase®) associada a um consórcio microbiano, obtido a partir de um efluente lácteo industrial.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Coleta e acondicionamento do efluente

A empresa fornecedora do efluente está localizada no município de São Bento do Una/PE e caracteriza-se como uma microempresa de caráter familiar, produtora de quatro diferentes tipos de queijo (coalho, muzzarella, ricota e manteiga), com produção média diária de 500kg, 300kg, 100kg e 200kg, respectivamente. A empresa também é produtora de outros derivados, como requeijão, doce de leite, manteiga e bebidas lácteas de vários sabores.

Foram coletados 50L do efluente, proveniente do processo industrial da fabricação do queijo de coalho, sem qualquer tipo de tratamento prévio, sendo a amostra transportada sob refrigeração em recipientes de polietileno com capacidade volumétrica de 20L.

As amostras foram homogeneizadas, distribuídas em garrafas plásticas limpas e não estéreis de 2L de capacidade e congeladas à temperatura de -20°C no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco.

3.2.2. Ensaios de Flotação

O soro de queijo foi submetido a ensaios de flotação, sendo utilizada uma coluna em escala de bancada, projetada e construída em vidro e acrílico. Os experimentos foram realizados em batelada de acordo com VILAR (2009), utilizando uma vazão de ar de 1.362 mL/min na

condição de pH do efluente (pH 5,0). O material flotado obtido foi congelado para sua posterior utilização nos ensaios de hidrólise.

3.2.3. Obtenção do consórcio microbiano

O consórcio microbiano foi obtido a partir de cultivo do efluente em biorreator de 2L de capacidade e 1,5L de volume útil, operando sob agitação mecânica de 200rpm, aeração de 1vvm e temperatura de 28 - 30°C. Os cultivos foram realizados em duplicata.

Cada reator permaneceu em funcionamento durante onze dias, sendo realizado um pulso corresponde a 10% (v/v) do volume do biorreator no sétimo dia de experimento. Foram retiradas amostras em duplicata de aproximadamente 10mL, sendo armazenadas em freezers para posterior análise da atividade lipásica.

3.2.4. Tratamento enzimático do flotado

Inicialmente foi realizado um planejamento experimental de duas variáveis (agitação e concentração de enzima) a dois níveis, com ensaios em triplicata no ponto central. A Tabela 3.1 mostra o planejamento experimental utilizado e os níveis das variáveis investigados.

Tabela 3.1 – Primeiro planejamento experimental utilizado nos ensaios de hidrólise

Experimentos	Nível da agitação	Agitação (rpm)	Nível da concentração de enzima	Concentração de enzima* (%)
1	- 1	0	- 1	1
2	- 1	0	+1	7
3	+1	200	- 1	1
4	+1	200	+1	7
5	0	100	0	4
6	0	100	0	4
7	0	100	0	4

Lipolase® (100T, Novozymes®)

Um segundo planejamento experimental foi realizado após seleção da condição de agitação a partir dos experimentos anteriores (150rpm). As condições experimentais são mostradas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Segundo planejamento experimental utilizado nos ensaios de hidrólise

Experimentos	Nível da concentração de enzima	Concentração de enzima* (%)	Nível da concentração de consórcio	Concentração de consórcio (%)
1	- 1	1	- 1	3
2	- 1	1	+1	6
3	+1	4	- 1	3
4	+1	4	+1	6
5	0	2,5	0	4,5
6	0	2,5	0	4,5
7	0	2,5	0	4,5

*Lipolase® (100T, Novozymes®)

Para a realização dos experimentos, uma quantidade de 2g do flotado foi transferida para Erlenmeyers de 250mL de capacidade, adicionando-se posteriormente um volume de 150mL de solução tampão Tris-HCl (pH 8,0). Os ensaios foram realizados por 48 horas e a cinética da hidrólise foi acompanhada pela dosagem do pH, concentração de ácidos graxos e atividade lipolítica. Os experimentos foram realizados a 30°C.

Os resultados foram avaliados utilizando-se o *software* Statistica® versão 6.0. Cabe ressaltar que os experimentos foram realizados randomicamente e o erro experimental do planejamento foi obtido através da média e desvio padrão dos pontos centrais que foram repetidos.

A avaliação estatística foi realizada investigando-se os resultados experimentais com ou sem efeitos de interação entre as variáveis, sendo considerados os melhores ajustes para os modelos empíricos propostos.

3.2.5. Determinações analíticas

- pH:

A variação do pH no meio reacional foi determinada por potenciometria, utilizando-se um pHmetro digital (ORION, modelo 20A).

- Atividade lipolítica:

Foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Vorderwulbecke, Kieslich, Erdmann (1992), utilizando o lipídeo paranitrofenilpalmitato (pNPP) que, por hidrólise, produz

ácido palmítico e um derivado de coloração amarela. Este é espectrofotometricamente determinado avaliando-se a coloração formada por unidade de tempo. As velocidades máximas das reações enzimáticas foram calculadas em função das leituras de absorbâncias medidas a 410nm, sendo determinadas as atividades lipolíticas utilizando-se o coeficiente de absorção molar do pNPP ($15 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). As medidas foram realizadas a cada 2 minutos em espectrofotômetro (Libra S32-Biochrom), por um total de 10min. A Unidade Internacional (UI) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que catalisa $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto nas condições da reação (pH 8,0; 30°C). As análises foram realizadas em triplicata.

- Caracterização do material flotado:

A concentração de óleos e graxas foi determinada por extração em Soxhlet, utilizando éter de petróleo como solvente, de acordo com o procedimento padrão descrito pela APHA (1992). O teor de óleos e graxas foi calculado através da Equação 3.1:

$$\text{Óleos e graxas (mg/L)} = \frac{(M_2 - M_1) \times 1000}{\text{Volume da amostra extraída (mL)}} - M_3 \quad (3.1)$$

onde:

M_1 = Peso do balão vazio (mg)

M_2 = Peso do balão com resíduo de óleos e graxas (mg)

M_3 = Valor da prova em branco (mg/L)

- Dosagem de ácidos graxos:

Parte 1 – Transesterificação das amostras

Inicialmente, as amostras foram submetidas a uma reação de transesterificação, que consiste numa reação química dos óleos ou gorduras com um álcool (metanol ou etanol), na presença de um catalisador (Figura 3.1).

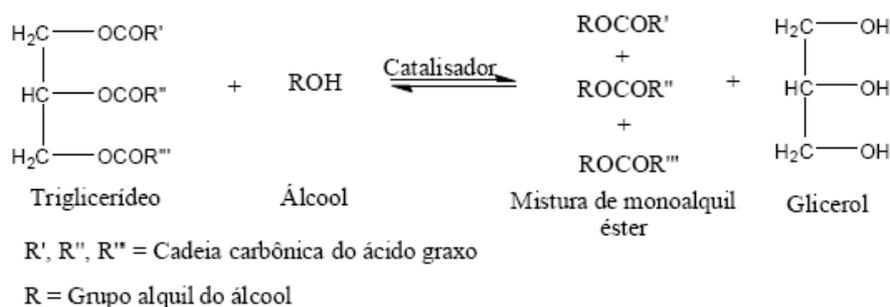


Figura 3.1 – Reação de transesterificação de triglicerídeos

A transesterificação das amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por HARTMAN e LAGO (1973). Inicialmente, era preparado o reagente de transesterificação por meio de refluxo de uma mistura contendo 2g de cloreto de amônio (NH_4Cl), 60mL de metanol (CH_3OH) e 3 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por 15 minutos. Em seguida, 0,5g da amostra era colocada num balão de 250mL, adicionando-se 5mL de solução de NaOH 0,5N em metanol. A mistura era submetida a refluxo por 5 minutos, quando era adicionada à solução ainda quente um volume de 15mL do reagente de transesterificação, deixando-se a mistura reacional em refluxo por mais 3 minutos.

A amostra era então resfriada e transferida para um funil de separação, adicionando-se 5mL de hexano e 10 mL de água saturada com cloreto de sódio. A mistura era agitada vigorosamente por alguns segundos e colocada em repouso para separação completa das duas fases. Após remoção da fase inferior (água, cloreto de sódio, excesso de álcool, glicerol e hidróxido de sódio), o balão era lavado com outra porção de 10mL de água saturada com cloreto de sódio. O material (mistura de ésteres metílicos dos ácidos graxos constituintes da amostra) era então transferido para frascos de penicilina, sendo adicionado sulfato de sódio anidro para remoção de toda umidade. Os frascos eram devidamente lacrados e conservados sob refrigeração (4°C) até a realização da análise cromatográfica.

Parte 2 – Análise cromatográfica

Foi utilizado um cromatógrafo a gás (marca MASTER CG) dotado de detector de ionização de chama, empregando-se uma coluna capilar (Zebron ZB-5) de sílica fundida contendo um filme com $0,25\ \mu\text{m}$ de polietilenoglicol (Carbowax 20M) de dimensões $30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 1\ \mu\text{m}$. A temperatura do detector foi de 250°C , a temperatura do vaporizador foi de 200°C , e o forno foi programado de acordo com as seguintes condições: 50°C durante 5 minutos; $5^\circ\text{C}/\text{min}$ até 110°C , permanecendo por 4 minutos, e $4^\circ\text{C}/\text{min}$ até 150°C , permanecendo por 5 minutos.

Foram utilizados como padrões amostras de concentrações conhecidas dos ácidos hexanóico, láurico, mirístico, palmítico, heptadecanóico e linoléico. Inicialmente era determinado o fator (f) referente a cada análise dos padrões de acordo com a Equação 3.2:

$$f = \frac{C}{A} \tag{3.2}$$

onde C é uma concentração conhecida da amostra-padrão (g/L) e A é a área dada pelo cromatograma. Em seguida, conhecendo-se as áreas dos cromatogramas para as amostras, o fator f era então utilizado para o cálculo das concentrações dos ácidos graxos não hidrolisados.

A quantificação dos ácidos graxos presentes no material flotado também foi avaliada de acordo com a metodologia acima descrita. Dessa forma, os ácidos graxos liberados durante a hidrólise (ácidos graxos livres-AGL) foram determinados de maneira indireta, utilizando-se a Equação 3.3:

$$\text{AGL} = \text{AGF} - \text{AGT} \quad (3.3)$$

onde:

AGF - ácidos graxos do flotado (g/L)

AGT - ácidos graxos dos triglicerídeos (não hidrolisados) (g/L)

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido um teor de 63,3% de óleos e graxas no material flotado. A Tabela 3.3 ilustra os resultados para as concentrações dos ácidos graxos presentes no material flotado. Pode ser observado que foi obtida uma concentração total de ácidos graxos equivalente a 13,36g/L, e que o ácido palmítico é o que está presente em maior concentração (9,59g/L). Estes resultados corroboram com os encontrados por Mendes *et al.* (2006), que observaram concentrações de ácidos graxos de cadeia longa em um efluente lácteo correspondentes a 39,2% para o palmítico, seguido do oléico (21,2%), esteárico (16,8%) e mirístico (13,9%). Os autores salientam ainda que as elevadas concentrações de ácidos graxos de cadeia longa no efluente em estudo ocorrem devido também à utilização de detergentes nas etapas de lavagem de pisos e tubulações.

Tabela 3.3 – Concentrações dos ácidos graxos presentes no material flotado

Ácido graxo	Concentração (g/L)
Hexanóico	0,48
Láurico	0,46
Mirístico	1,76
Palmítico	9,59
Heptadecanóico	0,33
Linoléico	0,74

A Figura 3.2 mostra um cromatograma típico obtido na análise de ácidos graxos.

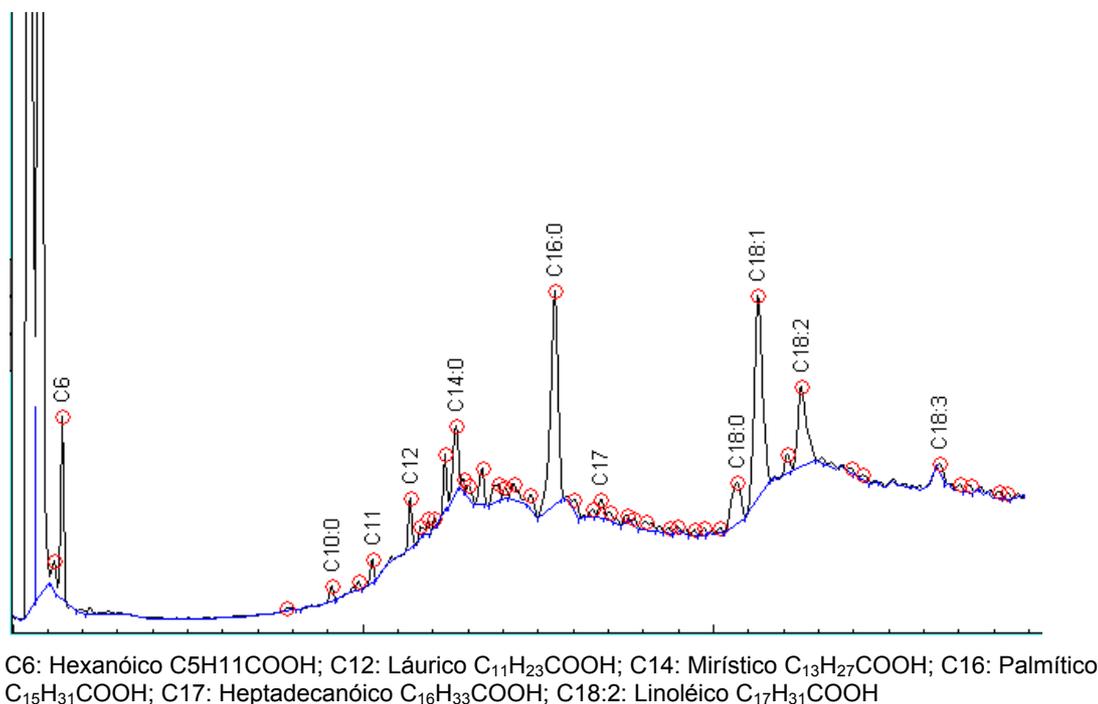


Figura 3.2 – Cromatograma típico da análise de ácidos graxos (Condições: coluna capilar de sílica fundida de dimensões 30m x 0,25mm x 1 μ m, temperatura do detector de 250°C; temperatura do vaporizador de 200°C; programação do forno: 50°C por 5min; 5°C/min até 110°C, permanecendo por 4 minutos, e 4°C/min até 150°C, permanecendo por 5 minutos)

No primeiro planejamento fatorial, verificou-se a influência das duas variáveis de entrada (concentração de enzima e agitação) sobre os valores das variáveis resposta (pH, concentração de ácidos graxos livres e atividade lipásica) do processo.

A Figura 3.3 apresenta a superfície de resposta e a curva de contorno para o percentual de liberação de ácidos graxos em função da concentração de enzima e da agitação para um tempo de hidrólise de 4 horas. Os resultados mostram que foram obtidos percentuais de liberação de ácidos graxos próximos a 100% para valores intermediários de agitação (entre 100 e 150rpm) e em maiores concentrações de enzima.

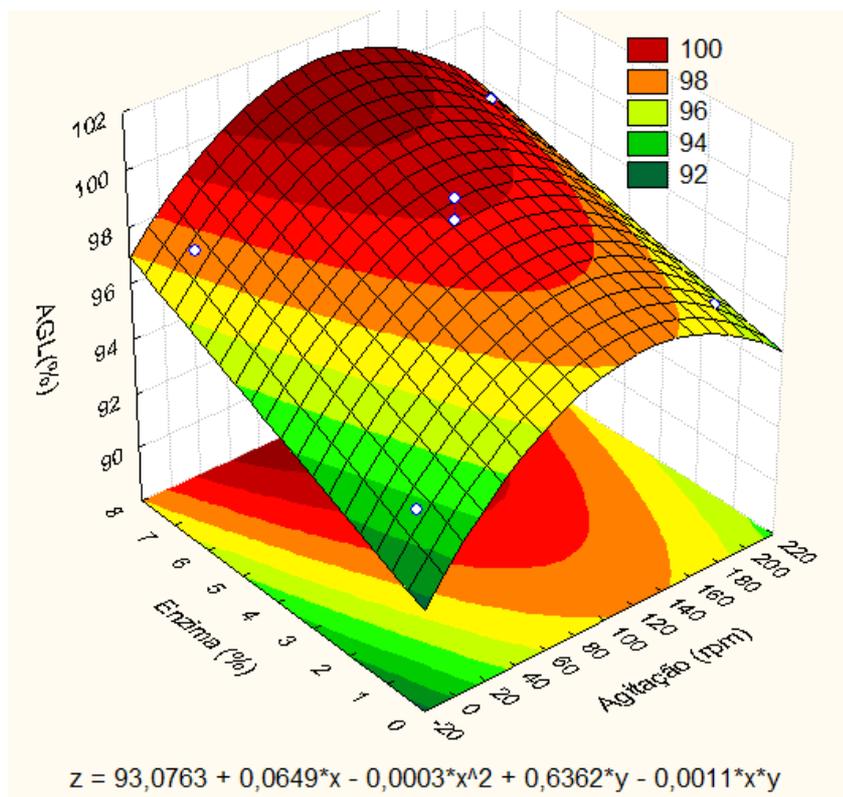
O diagrama de Pareto (Figura 3.4-A), que apresenta de forma clara os efeitos que são estatisticamente importantes, mostra que o termo quadrático da agitação e o termo linear da concentração de enzima são significativos. A Figura 3.4-B apresenta os resultados experimentais

versus os resultados previstos pelo modelo ajustado, mostrando uma boa concordância entre eles.

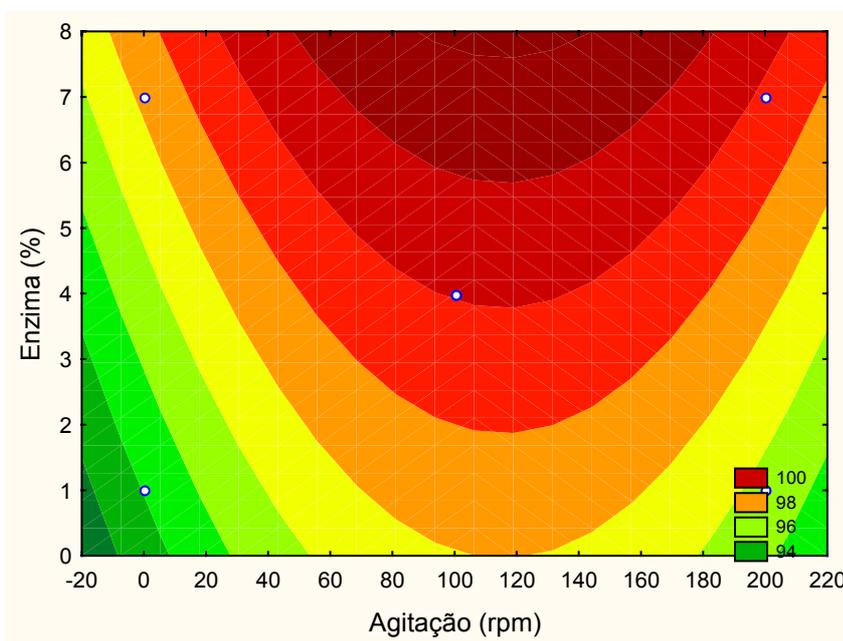
Para a variável resposta pH, considerando o mesmo tempo de hidrólise, o menor valor observado foi de 6,8 no mesmo intervalo de agitação e também em maiores concentrações de enzima (Figura 3.5). Neste caso, os termos significativos do modelo são os termos linear e quadrático da agitação (Figura 3.6-A), enquanto que pode ser observada uma boa concordância entre os resultados experimentais e os previstos pelo modelo ajustado (Figura 3.6-B).

O maior valor de atividade lipásica observado após 4 horas de hidrólise foi equivalente a 80UI/mL, como mostra a Figura 3.7. Como era esperado, esta condição foi atingida para as maiores concentrações de lipase e, em concordância com os resultados anteriores, nos valores intermediários de agitação. De acordo com a Figura 3.8, observa-se que a lipase e a agitação apresentam efeito positivo significativo ($p < 0,05$), sendo obtida uma boa concordância entre os resultados experimentais e os previstos pelo modelo ajustado.

As Equações 3.4, 3.5 e 3.6 representam os modelos empíricos ajustados para o percentual de liberação de ácidos graxos, pH e atividade lipásica, respectivamente, para um tempo de hidrólise de 4 horas, e suas respectivas variâncias explicadas. Os parâmetros em **negrito** são os estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança. A variável *z* representa o percentual de liberação de ácidos graxos na Equação 3.4, o pH na Equação 3.5 e a atividade lipásica na Equação 3.6, enquanto que as variáveis *x* e *y* expressam a agitação e a concentração de lipase, respectivamente.

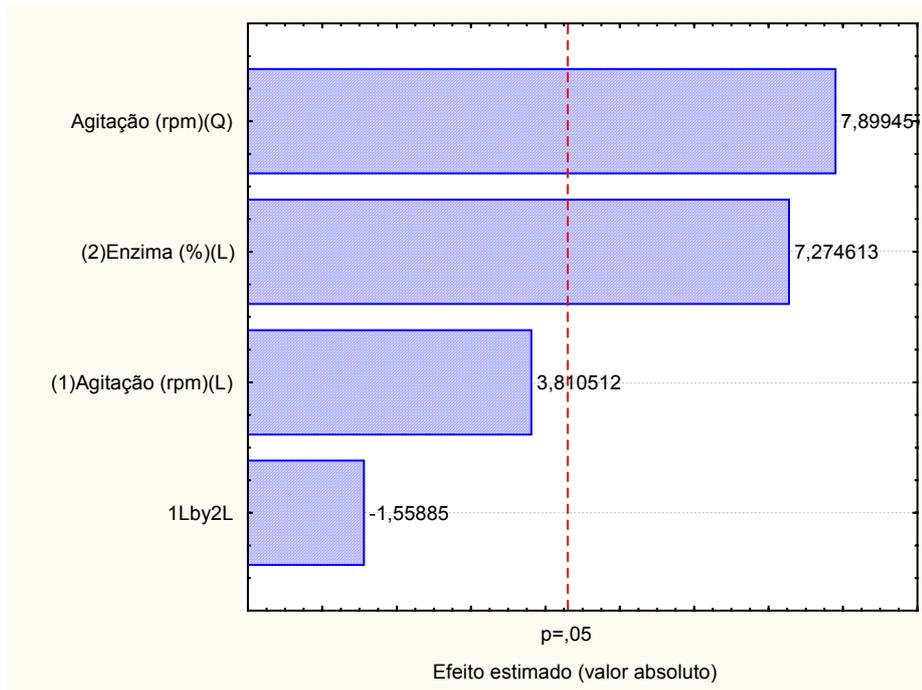


(A)

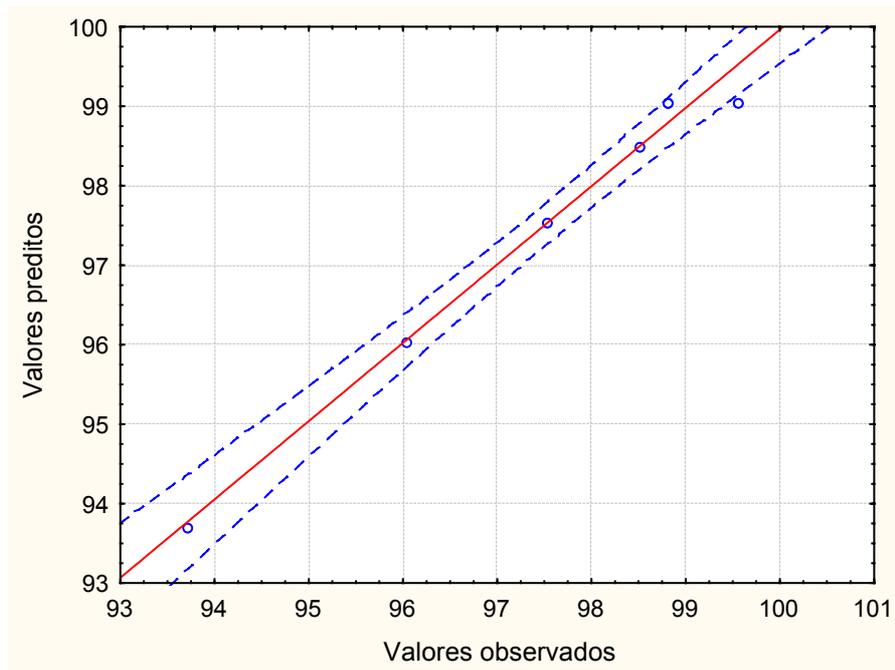


(B)

Figura 3.3 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância; teor inicial de ácidos graxos de 13,36g/L

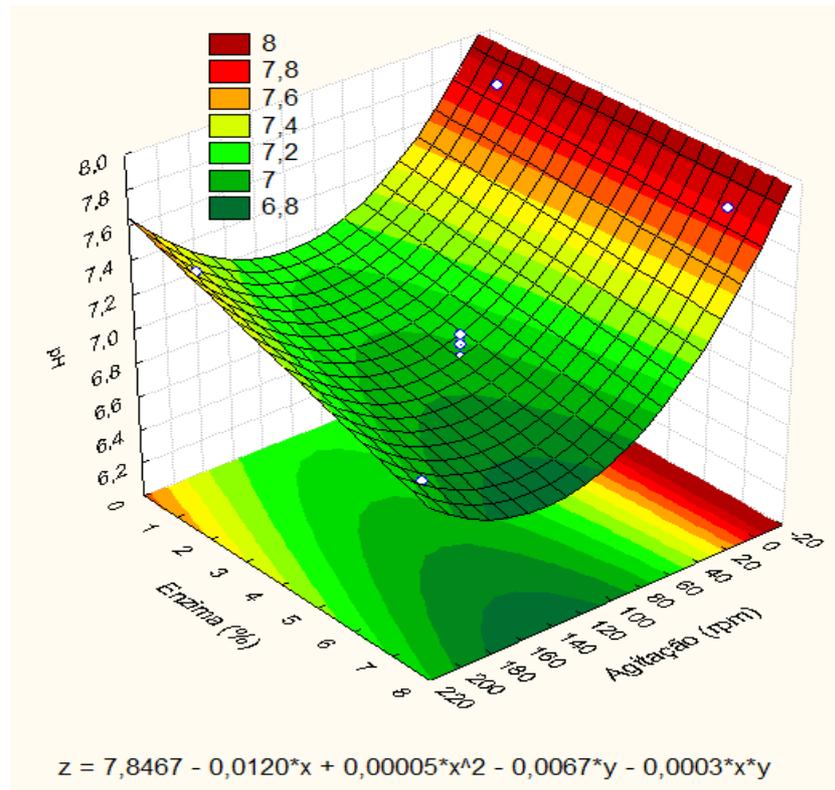


(A)

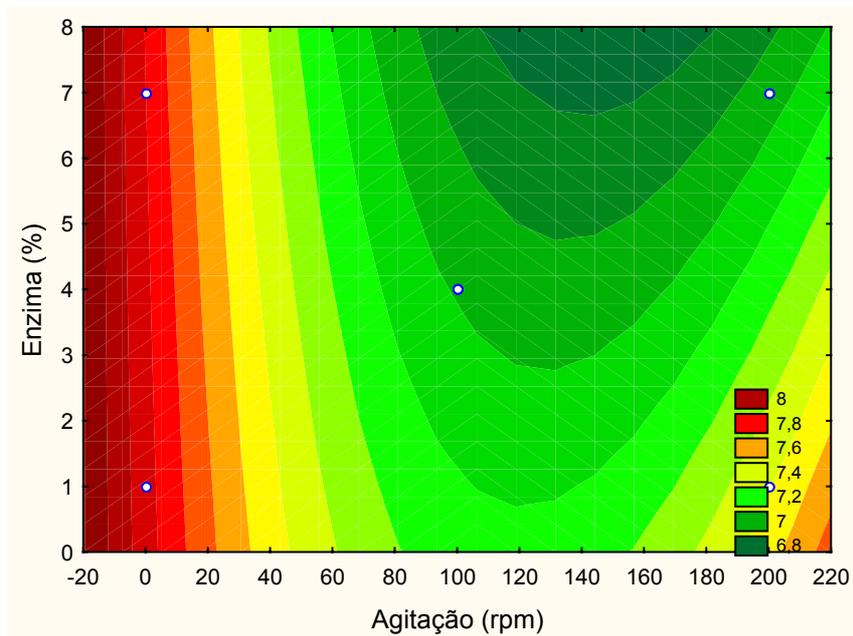


(B)

Figura 3.4 – Diagrama de Pareto (A) e valores preditos *versus* valores observados (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância; teor inicial de ácidos graxos de 13,36g/L)

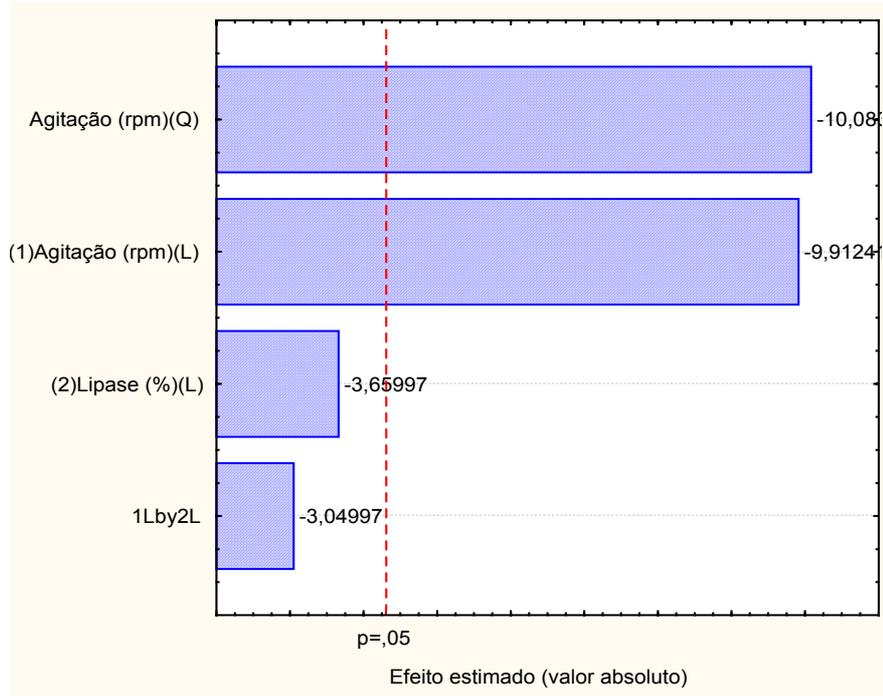


(A)

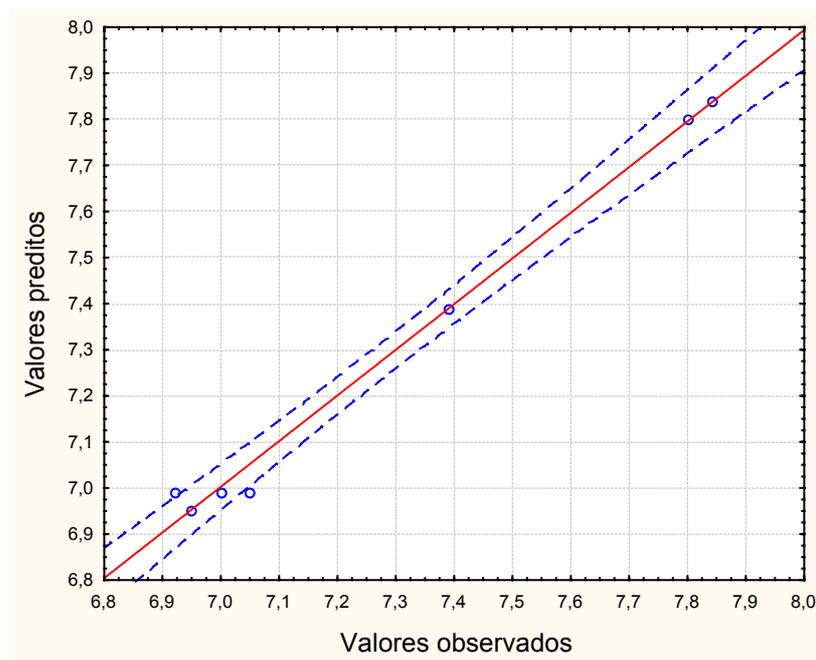


(B)

Figura 3.5 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o pH como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância)

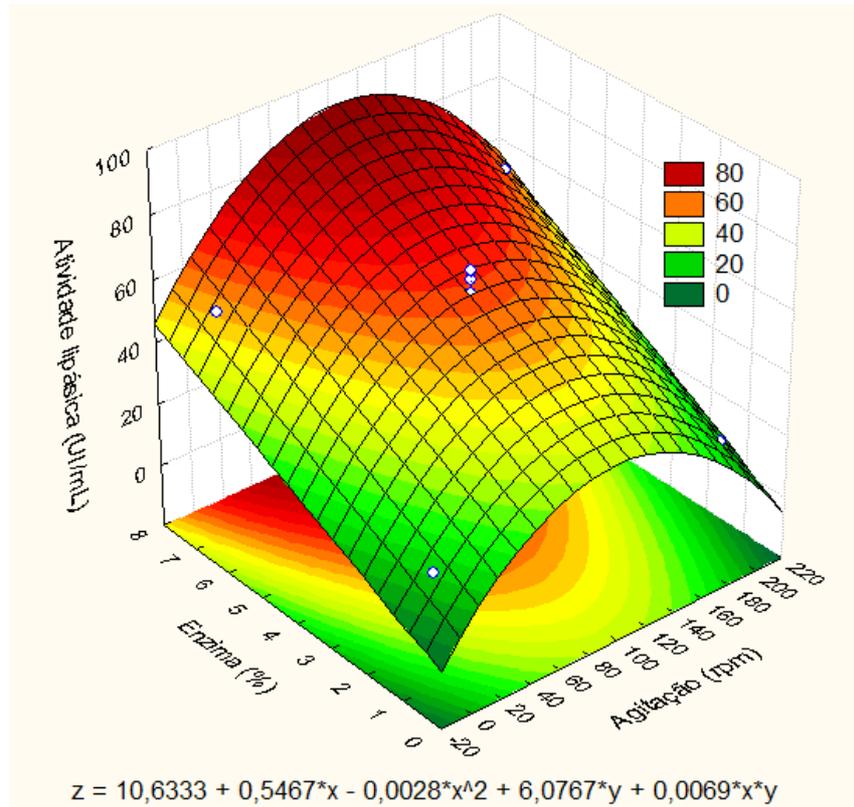


(A)

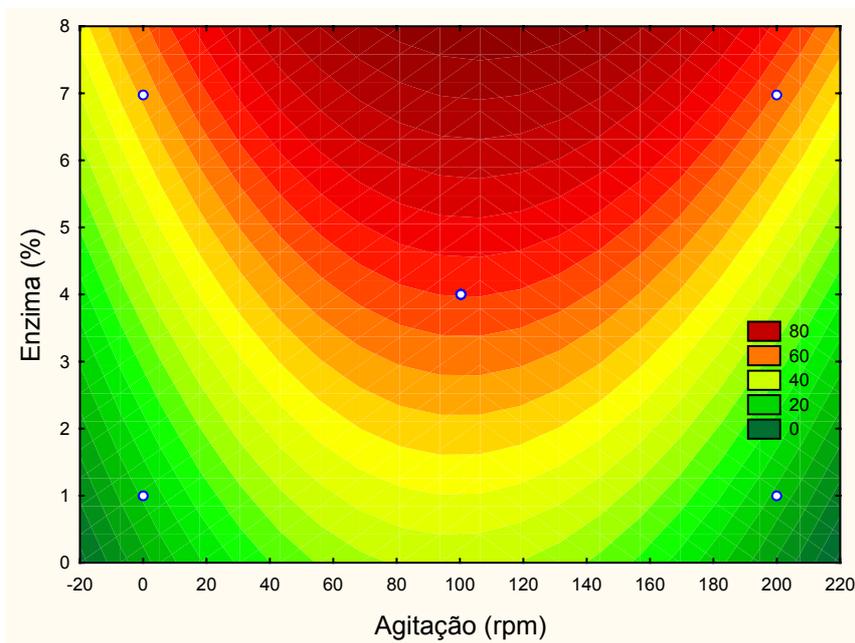


(B)

Figura 3.6 – Diagrama de Pareto (A) e valores preditos *versus* valores observados (B) para o pH como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância)

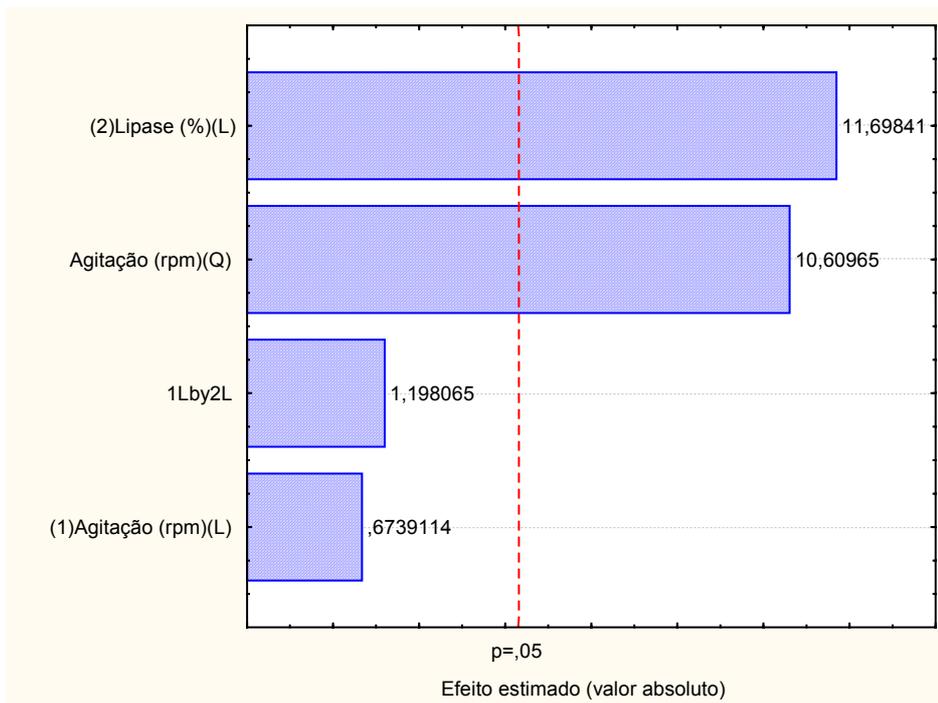


(A)

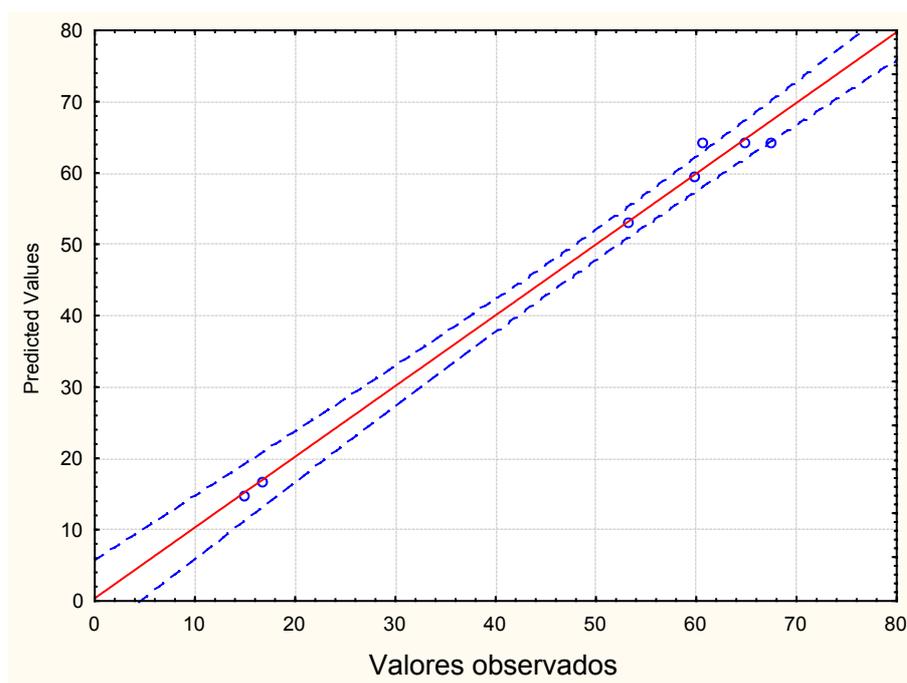


(B)

Figura 3.7 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a atividade lipásica como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância)



(A)



(B)

Figura 3.8 – Diagrama de Pareto (A) e valores preditos versus valores observados (B) para a atividade lipásica como função da concentração de enzima e da agitação (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância)

$$z = 93,0763 + 0,0649*x - 0,0003*x^2 + 0,6362*y - 0,0011*x*y; R^2 = 0,9851 \quad (3.4)$$

$$z = 7,8467 - 0,0120*x + 0,00005*x^2 - 0,0067*y - 0,0003*x*y; R^2 = 0,9911 \quad (3.5)$$

$$z = 10,6333 + 0,5467*x - 0,0028*x^2 + 6,0767*y + 0,0069*x*y; R^2 = 0,9921 \quad (3.6)$$

Na Tabela 3.4 encontram-se os parâmetros das análises de variância (ANOVA) (coeficiente de variação explicada - R^2 e teste F) para o ajuste dos modelos empíricos relatados anteriormente. Observa-se que os modelos são estatisticamente significativos, pois os coeficientes de variação explicada são satisfatórios e a razão de $F_{\text{calculado}}$ por F_{tabelado} está acima de 1, para um nível de confiança de 95% (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS 2001).

Tabela 3.4 - Parâmetros da análise de variância para o percentual de liberação de ácidos graxos, pH e atividade lipásica no primeiro planejamento experimental para um tempo de hidrólise de 4 horas.

Variável resposta	Variáveis significativas	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$ (95%)	F_{tabelado} (95%)	R^2
Percentual de liberação de ácidos graxos	Agitação (termo quadrático)	11,6536	1	11,6536	62,4014	10,13	0,9851
	Enzima (termo linear)	9,8829	1	9,8829	52,9200		
	Erro	0,3735	2	0,1867			
	Total	25,0755					
pH	Agitação (termo linear)	0,4225	1	0,4225	98,2558	10,13	0,9911
	Agitação (termo quadrático)	0,4372	1	0,4372	101,6711		
	Erro	0,0086	2	0,004300			
	Total	0,9659					
Atividade lipásica	Agitação (termo quadrático)	1357,152	1	1357,152	112,5648	10,13	0,9921
	Enzima (termo linear)	1649,984	1	1649,984	136,8528		
	Erro	24,113	2	12,057			
	Total	3054,031					

A Figura 3.9 mostra a aparência das amostras antes e após a hidrólise, podendo ser observada visualmente a completa dissolução do material flotado.



Figura 3.9 – Fotos do experimento de hidrólise. (A) antes da hidrólise e (B) após 48h de hidrólise

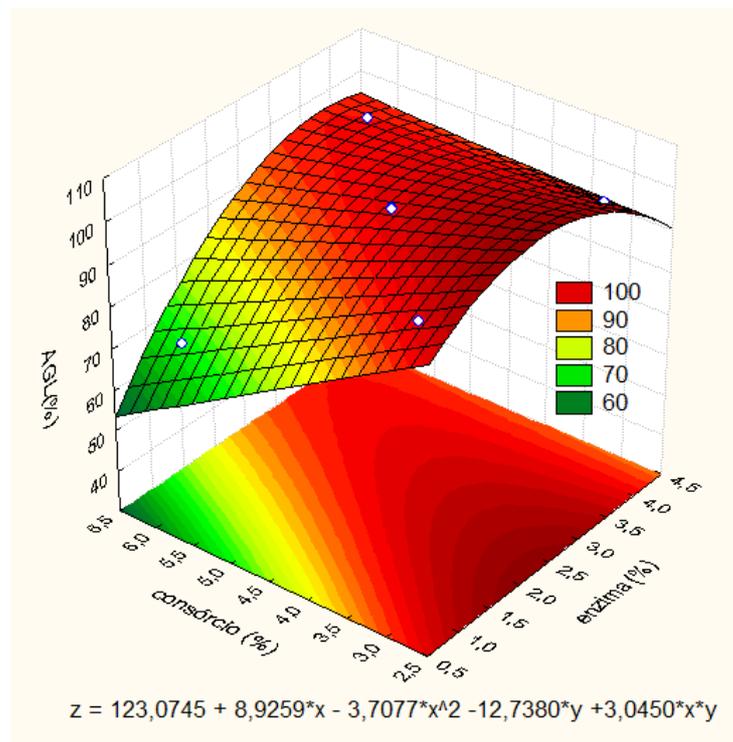
Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que, na faixa de concentração de enzima testada (1 a 7%), foram observados percentuais de liberação de ácidos graxos superiores a 92% em apenas 4 horas de hidrólise. Pereira *et al.* (2002), quando investigaram a remoção de carga lipolítica de um efluente industrial gerado em frigorífico de abate de frango utilizando lipases microbianas comerciais (*Candida rugosa* e Lipolase), observaram que a lipolase apresentou maior velocidade de reação em 4 horas, enquanto que a lipase de *Candida rugosa* necessitou de 6 horas para alcançar 100% de taxa de hidrólise.

Com o objetivo de avaliar a utilização de um consórcio microbiano obtido a partir do cultivo no próprio efluente, sobre a hidrólise do material flotado, um novo planejamento experimental foi realizado. Foram investigadas as variáveis concentração de enzima comercial e concentração de consórcio sobre as variáveis resposta anteriormente descritas.

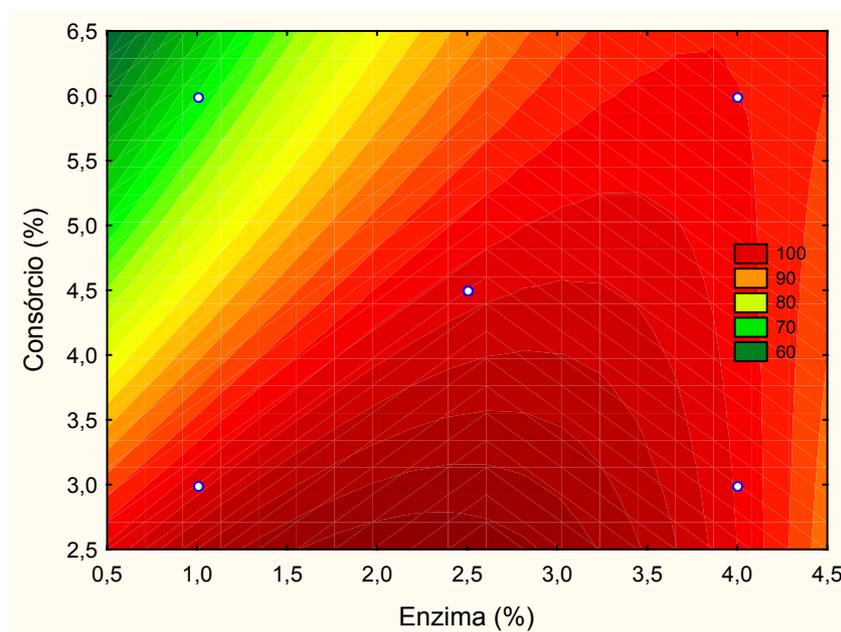
As amostras do consórcio selecionadas foram as que obtiveram uma maior atividade lipásica durante o cultivo do efluente em biorreator. Dessa forma, foram utilizadas as amostras correspondentes ao primeiro e terceiro dia do cultivo B (dados mostrados na Figura 2.5 do capítulo 2).

A Figura 3.10 mostra a superfície de resposta (A) e a curva de contorno (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos após 4 horas de hidrólise. Valores próximos a 100% de liberação de ácidos graxos foram atingidos para todas as concentrações de enzima testadas. Neste caso, maiores concentrações de consórcio não promoveram um incremento na concentração de ácidos graxos livres.

O Diagrama de Pareto (Figura 3.11-A) mostra que ambas as variáveis foram significativas a um nível de confiança de 95%, inclusive o fator de interação linear entre as mesmas. Os dados de ajuste do modelo empírico proposto mostram-se bem ajustados, como ilustra a Figura 3.11-B.

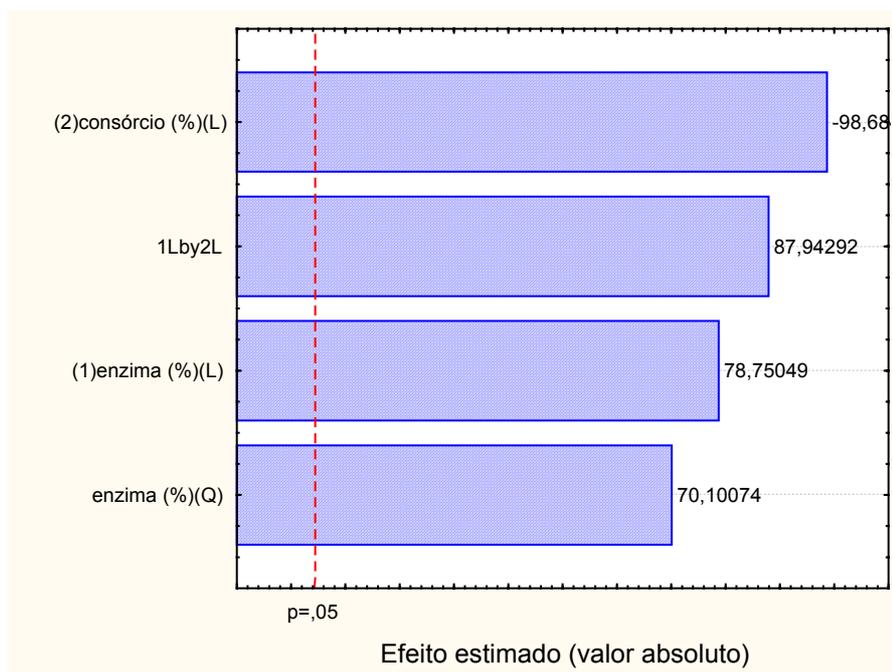


(A)

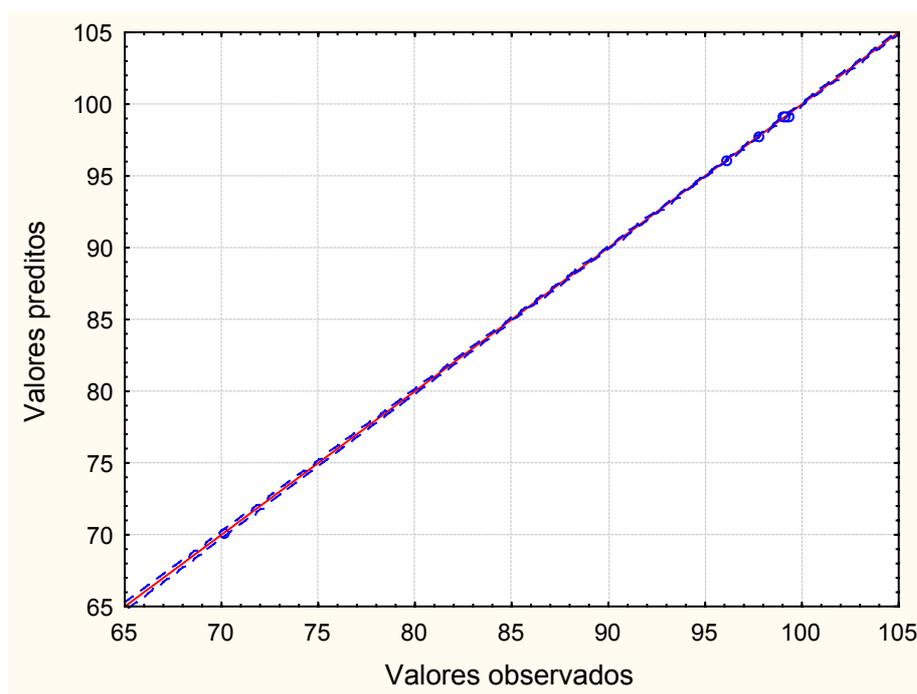


(B)

Figura 3.10 – Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos como função da concentração de enzima e da concentração de consórcio (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância; teor inicial de ácidos graxos de 13,36g/L)



(A)



(B)

Figura 3.11 – Diagrama de Pareto (A) e valores preditos *versus* valores observados (B) para o percentual de liberação de ácidos graxos como função da concentração de enzima e da concentração de consórcio (tempo de hidrólise de 4 horas; 95% de significância; teor inicial de ácidos graxos de 13,36g/L)

Para as variáveis resposta pH e atividade lipásica, a análise estatística realizada, considerando ou não os possíveis efeitos de interação, demonstrou que não houve significância para um nível de confiança de 95% para qualquer das variáveis testadas dentro da faixa estudada no planejamento de experimentos.

A Equação 3.7 mostra o modelo empírico ajustado para o percentual de liberação de ácidos graxos no tempo de hidrólise de 4 horas, e sua respectiva variância explicada. Os parâmetros em negrito são os estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança. A variável z representa o percentual de liberação de ácidos graxos, enquanto que as variáveis x e y expressam a concentração de lipase e a concentração de consórcio, respectivamente.

$$z = 123,0745 + \mathbf{8,9259*x} - \mathbf{3,7077*x^2} - \mathbf{12,7380*y} + \mathbf{3,0450*x*y}; R^2 = 0,9999 \quad (3.7)$$

Na Tabela 3.5 encontram-se os parâmetros das análises de variância (ANOVA) (coeficiente de variação explicada - R^2 e teste F) para o ajuste do modelo empírico. Observa-se que o modelo é estatisticamente significativo, com um coeficiente de variação explicada muito satisfatório (0,9999) e uma razão de $F_{\text{calculado}}$ por F_{tabelado} acima de 1, para um nível de confiança de 95%.

Tabela 3.5 - Parâmetros da análise de variância para o percentual de liberação de ácidos graxos no segundo planejamento experimental para um tempo de hidrólise de 4 horas.

Variável resposta	Variáveis significativas	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$ (95%)	F_{tabelado} (95%)	R^2
Percentual de liberação de ácidos graxos	Enzima (termo linear)	150,5621	1	150,5621	6201,640	10,13	0,9999
	Enzima (termo quadrático)	119,3038	1	119,3038	4914,114		
	Consórcio (termo linear)	236,4302	1	236,4302	9738,537		
	Interação enzima e consórcio	187,7634	1	187,7634	7733,957		
	Erro	0,0486	2	0,0243			
	Total	694,1081	6				

Podemos observar que a adição do consórcio microbiano não influenciou de maneira positiva para o aumento do teor de ácidos graxos livres no meio. No entanto, o modelo empírico mostra que há um forte efeito de interação entre as variáveis enzima e consórcio microbiano. Os resultados sugerem que concentrações menores de enzima podem ser empregadas para o tratamento hidrolítico do material flotado.

3.4. CONCLUSÕES

Em todos os experimentos utilizando apenas a enzima lipase, observou-se que houve a liberação de ácidos graxos no meio em percentuais próximos a 100% apenas após 4 horas de reação em maiores concentrações de enzima considerando a faixa de concentração investigada (1 a 7%) e para níveis de agitação entre 100 e 150rpm. O emprego da enzima associada a um consórcio microbiano obtido a partir do próprio efluente poderia vir a viabilizar economicamente o processo. No entanto, testes de hidrólise demonstraram que a adição do consórcio microbiano não influenciou de maneira positiva para o aumento do teor de ácidos graxos livres no meio. Ensaio adicionais são ainda necessários para avaliar o efeito da adição da enzima em menores concentrações sobre a hidrólise do material flotado de efluente de laticínios.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro (número de processo 485292/2006-8), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado, à empresa Laticínios São Bento, pela doação do soro de leite. Os autores agradecem ainda ao professor Alexandre Schuler, pelo auxílio na realização das análises cromatográficas.

3.5. REFERÊNCIAS

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, (1992), *Standard Methods for Water and Wastewater*, 18th ed., APHA.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, J.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. Editora Unicamp, Campinas, São Paulo, 401p., 2001.

HARTMAN, L., LAGO, R.C. A . Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids. Londres: **Laboratory Practices**., v. 22, p. 475-476, 1973.

KITCHENER, J. A., The froth flotation process: Past, present and future-in brief. In: *The Scientific Basis of Flotation, Part 1*. NATO Advances Study Institute, pp. 1-26, 1985

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 diary wastewater - **Process Biochemistry**, v.46, pp. 1173-1178, 2006.

LUNA, C. L.; **Avaliação de técnicas de separação fluido-sólido na produção de bioinseticidas a partir de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

MASSE, L.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S., Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, v.77, pp. 145-155, 2001.

MENDES, A.A.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F. Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratadas por lipases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, pp. 143-149, 2006.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMISTHITI, S., Biodegradation of lipid-rich wastewater by mixed bacterial consortium - **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.50, pp.101-105, 2002.

PEREIRA, E.B.; TEIXEIRA, R.M.; DE CASTRO, H.F., FURIGO Jr., A., Tratamento enzimático utilizando lipases em rejeitos industriais frigoríficos, XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química-COBEQ, Natal, RN, 2002.

RIGONI, R. E.; RIGO, E.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, D.; Di LUCCIO, M.; Utilização de lipase como auxiliar na degradação de gordura do flotado de indústria de carnes, XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis, 2003.

VILAR, A.C., **Utilização da flotação em coluna para o tratamento de efluente da indústria láctea**, Dissertação de mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, 2009.

VORDERWULBECKE, T.; KIESLICH, K.; ERDMANN, H. Comparison of lipases by different assays. *Enzyme Micro. Technol.*, v. 14, pp. 631-639, 1992.