UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

JAQUELINE GRECO DUARTE

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E DIGESTÃO ANAERÓBIA TERMOFÍLICA DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PESCADO

RIO DE JANEIRO

2013

JAQUELINE GRECO DUARTE

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E DIGESTÃO ANAERÓBIA TERMOFÍLICA DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PESCADO

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

Orientadoras: Prof^{a}. Dr^{a}. Magali Christe Cammarota
Prof^{a}. Dr^{a}. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

RIO DE JANEIRO
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Jaqueline Greco

Hidrólise Enzimática e Digestão Anaeróbia Termofílica de Efluente de Indústria de Pescado. Jaqueline Greco Duarte - 2013. 102 p.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Departamento de Engenharia Bioquímica, Rio de Janeiro, 2013.

Orientadoras: Prof^{a}. Dr^{a}. Magali Christe Cammarota
Prof^{a}. Dr^{a}. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

1. Lipase 2. Hidrólise 3. Tratamento anaeróbio

I. Cammarota, M.C. , Gutarra, M.L.E.

II. EQ/UFRJ

III. Título

JAQUELINE GRECO DUARTE

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E DIGESTÃO ANAERÓBIA TERMOFÍLICA DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PESCADO

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

_____

Prof^{a}. Dr^{a}. Magali Christe Cammarota

_____

Prof^{a}. Dr^{a}. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

_____

Prof^{a}. Dr^{a}. Elisa d'Avila Cavalcanti-Oliveira

_____

Prof^{a}. Drª Karen Signori Pereira

_____

Prof. Dr Rodrigo Volcan Almeida

Dedicatória

Aos meus amores, meus exemplos...

À minha vozinha Euphrasia, meu grande exemplo de sabedoria e de força de vontade, a quem sempre pedi auxílio para seguir em frente nas minhas preces... eternamente em nossos corações... um dia nos reencontraremos.

A meu pai, meu Zé, que foi e sempre será minha base forte, minha estrutura. Com quem aprendi que a vida é muito mais do aquilo que podemos ver e tocar. A quem devo meus princípios, minha curiosidade, meu amor e determinação a tudo que eu faço.

À minha mãe Maria, que quase virou uma sardinha de tanto limpá-las para que eu pudesse fazer meu efluente. “E tua pesquisa, filha, vai bem?” Cientista nata, a quem devo minha teimosia... minha bonequinha que diz “não”. Tua dedicação a tudo e a todos é minha guia. Sempre em frente!

Ao meu menininho, meu irmão Daniel. O engenheiro mais biólogo que eu conheço, que me deu forças para seguir o meu caminho e ser aquilo que vim talhada para ser.

À minha flor, minha prima-irmã Ive, a quem devo grande parte do que sou hoje. A primeira mestre da família!! Obrigada pela força, pelos conselhos, pelas inúmeras conversas que eu só poderia ter com você. Entende-me só de olhar, um simples abraço já me faz a pessoa mais alegre do mundo.

À minha tia-mãe Ana, minha flor querida, meu exemplo de mulher que sempre busca aprender. Obrigada por ser quem você é, por me aconselhar, pela liberdade que me transmite em suas conversas... enfim, por ser minha grande amiga.

À minha família como um todo.
Ter vocês na minha vida é o melhor e maior presente que eu poderia ter.
MUITO OBRIGADA!!
Amo demais!!

Esta dissertação também é de vocês.

Agradecimentos

Nossa... muito a agradecer. Espero por meio destas páginas conseguir demonstrar minha eterna gratidão a todos aqueles que participaram desta jornada comigo.

A Deus
"...desde que se trata de uma manifestação que se produz com exclusão das leis da Humanidade, ela escapa à competência da ciência material, visto não poder explicar-se por algarismos, nem por uma força mecânica." Allan Kardec

Às minhas orientadoras Magali Cammarota e Melissa Gutarra. E a minha sempre orientadora Denise Freire. Por toda a determinação, presteza, auxílio... por me passarem sempre a idéia otimista de que tudo ia dar certo. "Isso é ciência!" Vocês são minhas mães científicas. Esta dissertação é para vocês.

A todos os labinianos - e são muitos! Aline, Anderson, Antônio, Arthurzinho, Arthur, Barbara, Bruno, Bruno Dias, Carol, Douglas, Elisa, Erika, Evelin, Fabio, Grazi, Grazi baiana, Ingrid, Jaque 1, Joab, Lívia, Maysa, Mari, Mateus, Mel, Nath, Pri, Ricardo, Robertinha, Tais, Tayrinni, Val, meus amigos, pessoas queridas com quem tanto aprendi e aprendo até hoje. Obrigada pelas conversas descontraídas, pelo ambiente agradabilíssimo de trabalho, por todo o carinho, por escutarem minhas reclamações em dias de hidrólise e mesmo assim me fazerem rir... por virarem a noite trabalhando no laboratório comigo (né, Evelin?), pela preocupação quando estava sozinha no lab... por tudo! Adoro vocês!

À Juliana Garcia, que mais me ensinou do que eu a ela.
À Larissa Silva, por TODO o apoio que me deu cuidando dos nossos bebês enquanto eu brigava com os fungos e suas proteases.
À Tayrinni Correia, por entender minha ausência, tocar seus experimentos e por se preocupar tanto comigo.
A todas vocês, minhas filhas, pela paciência e por terem me ensinado muitas coisas e dentre estas a arte de ensinar.

Aos meus amigos e amiga eletrônicos: Felipe, Danilo, Claudio, Simão, Zheng, Govinda, Gustavo, Paulo e Vitor, por estarem sempre comigo e me ajudarem. Pelas conversas descontraídas e pelas “cabeça” que as vezes eu nada entendo mas me divirto só de ouví-los conversar (Salve algoritmos!), por entenderem quando tive que me ausentar e principalmente por não me deixarem esquecer de viver.

Aos biólogos do meu coração: Laura, Camila, Gui, Boneca, Barbie e Coelha... por terem aquele ombro amigo a minha espera. Estar com vocês é sempre tão bom! Em breve será a vez de vocês! Obrigada por tudo.

Ao meu namorado, Marcelo Domingues por todo o carinho e dedicação com que me ajudou em todo este final de dissertação!

Ao LTA
“... a vida é muito mais do que parece ser. Vivemos rodeados de energias sutis que trocamos com as pessoas e essa troca determina os fatos em nossa vida. Nossa atitude interior imprime nas energias que emitimos os sentimentos nos quais acreditamos”.

Obrigada por terem me acolhido e a todos que me desejaram bem! Um agradecimento especial a Suzi que se desdobrou a fim de me ajudar com as muitas cromatografias no final dos experimentos da minha dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa e financiamento do projeto.

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”

Albert Schwweitzer (Nobel da Paz - 1952).

Duarte, Jaqueline Greco. Hidrólise Enzimática e Digestão Anaeróbia Termofílica de Efluente de Indústria de Pescado. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Escola de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Efluentes de indústrias de processamento de pescado apresentam elevada temperatura, demanda química de oxigênio (DQO) e concentração de óleos e graxas (O&G), podendo acarretar sérios danos ambientais se tratados e descartados de forma inadequada. A aplicação de enzimas é uma alternativa que pode melhorar o tratamento destes efluentes. Em um estudo anterior, uma etapa de hidrólise de 8h com 0,5% ou 0,67 U/mL de efluente proveniente de um *pool* enzimático contendo lipases (obtido por fermentação em estado sólido com o fungo *Penicillium simplicissimum* empregando torta de babaçu como substrato) seguida de tratamento anaeróbio por até 12 dias, foi a melhor condição de tratamento para um efluente contendo 1500 mg O&G/L. Ambas as etapas foram conduzidas a 30ºC. Considerando que o *pool* de lipases produzido pelo fungo filamentoso *P. simplissicimum* apresenta atividade ótima a 50ºC e que o efluente de indústrias de pescado pode ser gerado a altas temperaturas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da hidrólise e tratamento anaeróbio a 50ºC. Para tal, foi utilizado um efluente sintético com composição similar ao industrial, ajustando-se a concentração de O&G para 1500 mg/L. Cinéticas de hidrólise foram realizadas com diferentes atividades lipásicas (0; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,67 U/mL de efluente) verificando-se que com 0,16 e 0,32 U/mL eram produzidos 4,71 ± 0,96 e 6,60 ± 0,26 µmol/mL de ácidos livres, respectivamente, após 4h de hidrólise a 50ºC. Estas atividades foram então empregadas nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia a 50°C. Em três bateladas consecutivas com 0,16 U/mL de efluente, obteve-se produção específica de metano (PEM) de 117, 115 e 10 mL CH_4/g $DQO_{removida}$. Estes resultados sugerem uma possível inibição na produção de biogás na terceira batelada. Testes com diferentes níveis de protease apresentaram resultados semelhantes, sugerindo que altos níveis de protease não interferem no tratamento anaeróbio. Pôde-se observar também que ao manter-se os reatores sem alimentação durante uma semana a 50°C, a cada duas bateladas o lodo se recuperava e o tratamento voltava a apresentar resultados similares aos obtidos nas primeiras bateladas. No entanto, em testes comparativos, sem o tempo de "recuperação do lodo", conduzidos em três condições: termofílica (hidrólise e tratamento anaeróbio a 50ºC), mesofílica (hidrólise e tratamento anaeróbio a 30ºC) e híbrida (hidrólise a 50°C e tratamento anaeróbio a 30°C), observou-se que os melhores resultados (97,5% de remoção de DQO e 105,4 mL de CH_4/g $DQO_{removida}$) foram obtidos na condição híbrida em apenas 68h de tratamento. Os resultados obtidos mostraram que a hidrólise termofílica, além de permitir uma diminuição relevante na atividade enzimática utilizada e no tempo de reação, se aplicada em conjunto com um tratamento anaeróbio mesofílico acelera este processo. Tal condição diminui os custos totais do tratamento sendo, portanto, um importante alvo de estudos para uma possível aplicação industrial.

Palavras Chave: Lipase. Hidrólise. Tratamento Anaeróbio.

Duarte, Jaqueline Greco. Thermophilic Enzymatic Hydrolysis and Anaerobic Digestion of Wastewater from Fishery Industry. Dissertation (Master of Science in Technology of Biochemical and Chemical Processes), School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro.

Wastewaters generated by fishery industries have elevated temperature and high contents of O&G (mg/L) and COD that can cause disturb to the environment if the treatment is inappropriated. The use of a lipase-rich solid enzymatic preparation (SEP) obtained by the solid-state fermentation of the fungus *Penicillium simplicissimum* in babassu cake as cultive medium can be an important alternative to improve the treatment. Previously, a study found the best condition of treatment with 8h hydrolysis using 0.5% (SEP) or 0.67 U/mL wastewater followed by an anaerobic treatment that was conducted for 12 days both conducted at 30℃. Considering that the optimal temperature of the lipases produced by the fungus *P. simplicissimum* is 50℃ and the wastewater of the fishery industry can be generate at high temperatures the aim of this study was evaluate the efficiency of a thermophilic hydrolysis and anaerobic treatment both at 50℃. In this work a synthetic wastewater was utilized that contains a similar composition of the industrial one that was diluted to obtain 1500mg O&G/L. Kinects hydrolysis were carried out with different lipase activities (0; 0.04; 0.08; 0.16; 0.32; 0.67 U/mL wastewater) and the better results were obtained at 4h utilizating 0.16 e 0.32 U/mL that produced 4.71 ± 0.96 e 6.60 ± 0.26 µmol/mL free acids, respectively. These activities were employed in the anaerobic treatment at 50℃. Three consecutives contacts of the pre-treated effluent and the sludge was made. The methane specific production with the utilization of 0.16 U/mL wastewater was 117, 115 e 10 mL CH_4/g $COD_{removed}$ These results suggests that possibly there is an inhibition in the production of biogas in the third contact. Tests have been made using differents protease activity the results show that even with the distinct levels of proteases the results are the same what suggest that the use of proteases doesn't affect the anaerobic treatment. We also observed that the sludge can recover itself, producing biogas as the first contact, if the bioreactors was maintained without feeding at 50℃ for a week. However, comparative tests are made, without the time of "recover of the sludge", using three differents conditions: termophilic (hydrolysis and anaerobic treatment at 50℃), mesophilic (hydrolysis and anaerobic treatment at 30℃) and hybrid (hydrolysis at 50℃ and anaerobic treatment at 30℃). The better results (97.5% of COD removal and 105.4 mL CH_4/g $DQO_{removed}$) was obtained in the hybrid condition in only 68h of treatment. The results showed that the use of a thermophilic hydrolysis can decrease the enzymatic activity and if this step will made together with mesophilic anaerobic treatment it can accelerate the process. The results showed that the hybrid treatment can represent the decrease of the total costs of the processes what turn this treatment an important target for one future industrial application.

Key Words: Lipases. Hydrolysis. Anaerobic Treatment.

SUMÁRIO

1. Introdução e Objetivos 1
1.1. Introdução 1
1.2. Objetivos 4
2. Revisão Bibliográfica 5
2.1. Panorama geral da produção e consumo de pescado 5
2.2. Impactos ambientais causados por efluentes de indústrias de pescado . 8
2.3. Efluentes gerados nas indústrias de pescado 10
2.3.1. Caracterização 10
2.3.2. Legislação ambiental 12
2.3.3. Tratamento de efluentes 15
2.3.4. Tratamento biológico anaeróbio 18
2.3.4.1. Fundamentos da digestão anaeróbia 18
2.3.4.2. Digestão anaeróbia termofílica 22
2.4. Enzimas no tratamento de efluentes 24
2.5. Métodos de produção de enzimas 25
2.5.1. Fermentações 25
2.6. Lipases 28
2.6.1. Características gerais 28
2.6.2. Aplicações de lipases 30
2.6.2.1. Aplicações de lipases no tratamento de efluentes 32
2.6.3. Produção de lipases por FES 34
2.6.4. Lipase de *Penicillium simplicissimum* 35
3. Material e métodos 36
3.1. Efluente sintético empregado nos experimentos de hidrólise e biodegradabilidade 36
3.2. Hidrólise enzimática 36
3.2.1. Micro-organismo produtor de lipase: origem e manutenção 36
3.2.2. Preparo do inóculo 37
3.2.3. Fermentações submersas: meios de cultivo e condições 37
3.2.4. Fermentações no estado sólido 38
3.2.5. Condução dos experimentos de hidrólise 39

3.2.6. Cálculo da quantidade de PES/PEL para cada hidrólise 40
3.2.7. Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia 41
3.2.7.1. Adaptação do lodo..... 42
3.3. Métodos analíticos..... 42
3.3.1. Teor de umidade na FES 42
3.3.2. Determinação da atividade lipásica..... 43
3.4.3. Determinação da atividade Proteásica..... 44
3.3.3. Ácidos Livres..... 44
3.3.4. pH 45
3.3.5. Demanda Química de Oxigênio (DQO)..... 45
3.3.6. Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)..... 46
3.3.7. Óleos e Graxas no Efluente (O & G)..... 47
3.3.8. Fósforo Total (PT) 48
3.3.9. Nitrogênio Kjeldahl total (NKT)..... 49
3.3.10. Sólidos Totais, Fixos e Voláteis (ST, SFT e SVT)..... 50
3.3.11. Medição e Análise da Composição de Biogás 51
4. Resultados e Discussão..... 52
4.1. Caracterização do efluente..... 52
4.2. Hidrólise enzimática..... 53
4.2.1. Produção de enzimas em fermentação no estado sólido utilizando a torta 1..... 53
4.2.2. Produção de enzimas em fermentação no estado sólido utilizando a torta 2..... 54
4.2.3. Produção de enzimas em fermentação submersa..... 58
4.3. Testes de hidrólise do efluente..... 60
4.3.1. Testes de hidrólise utilizando a torta 1..... 60
4.3.2. Testes de hidrólise utilizando a torta 2..... 65
4.4. Avaliação da hidrólise termofílica com PEL produzidos nos meios FS e FSB..... 68
4.5. Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia e produção específica de metano (PEM) 69
4.5.1. Teste com diferentes atividades lipásicas: 0,16 e 0,32 U/mL de efluente..... 70
4.5.2. Estudo da influência das proteases na PEM..... 75

4.5.3. Cinéticas comparativas entre PEM e remoção de DQO 78
5. Conclusões e sugestões 84
Referências 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Produção pesqueira mundial nos anos de 2008 e 2009.....6
Tabela 2.2 - Caracterização dos efluentes de pescado.....12
Tabela 2.3 - Exemplos de resíduos utilizados para a produção de lipase microbiana por FES.....34
Tabela 4.1 - Caracterização do efluente sintético em comparação a efluente industrial.....52
Tabela 4.2 - Produção de ácidos livres na hidrólise do efluente conduzida a 50°C em 4 e 24 horas.....62
Tabela 4.3 - Produção de ácidos livres em 4 e 24 h de hidrólise do efluente a 50ºC com diferentes atividades lipásicas e na condição Controle.....64
Tabela 4.4 - Produção de ácidos livres em 4 e 24 h de hidrólise do efluente a 50°C utilizando PES proveniente da torta 2 com diferentes atividades lipásicas e na condição Controle.....66
Tabela 4.5 - Produção de ácidos graxos livres após 4 h de hidrólise do efluente a 50ºC com PES proveniente da torta 2 e diferentes atividades lipásicas e na condição Controle.....67
Tabela 4.6 - Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia termofílica para a utilização do PES da torta 2 com 0,16 e 0,32 U/mL de efluente e na condição Controle.....72
Tabela 4.7 - Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia termofílica para as seguintes condições: Controle, FS, FSB e FES, todas com 0,16 U/mL de efluente.....76

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Consumo per capita aparente no Brasil de 2001 até 2010.....7
Figura 2.2 - Esquema do balanço de DQO em reatores aeróbios e anaeróbios.....17
Figura 2.3 - Metabolismo e micro-organismos responsáveis pela digestão anaeróbia.....20
Figura 2.4 - Representação das principais reações catalisadas por lipases....28
Figura 2.5 - Representação tridimensional da lipase de *Pseudomonas aeruginosa.* (a) Conformação aberta da "tampa" que mostra a cavidade com o sítio ativo representado pelas cores amarela e verde. (b) Conformação fechada da "tampa" representada pelas cores vermelha e azul.....30
Figura 4.1 - Variação das atividades proteásica e lipásica (a 50°C) durante FES com 15g de torta, 6,25%(m/m) de melaço e 65% de umidade inicial.....55
Figura 4.2 - Atividades proteásica e lipásica (a 50°C) na condição 2 - 10g de torta, 6,25%(m/m) de melaço e 65% de umidade inicial.....56
Figura 4.3 - Atividades proteásica e lipásica (a 50°C) na condição 3 - 15g de torta, 6,25%(m/m) de melaço e 70% de umidade inicial.....57
Figura 4.4 - Atividades proteásica e lipásica (50°C) na condição 4 - 10g de torta, 6,25%(m/m) de melaço e 70% de umidade inicial.....57
Figura 4.5 - Atividades lipásica e proteásica, em 96 h de fermentação com meio sintético (FS) e com 2,5% de torta de babaçu (FS com babaçu).....59
Figura 4.6 - Variação do teor de ácidos livres com o tempo de hidrólise (50°C) de efluente de pescado sintético contendo 1500 mg O&G/L.....61
Figura 4.7 - Variação do teor de ácidos livres com 0,16 e 0,32 U/mL e no Controle na hidrólise (50°C) de efluente de pescado sintético contendo 1500 mg O&G/L.....63
Figura 4.8 - Variação do teor de ácidos livres com o tempo de hidrólise (50°C) de efluente de pescado sintético contendo 1500mg O&G/L utilizando diferentes concentrações de PES proveniente da torta 2.....66
Figura 4.9 - Produção de ácidos livres com o tempo de hidrólise a 50ºC com preparados enzimáticos provenientes de fermentação com meio sintético (FS), com torta de babaçu em água (FS com babaçu) e FES, todas com atividade lipásica de 0,16 U/mL.....69

Figura 4.10 - Perfil de produção de biogás a 50ºC na condição Controle e com efluente previamente hidrolisado com 0,16 e 0,32 U/mL de atividade lipásica: primeiro contato do lodo com o efluente.....70
Figura 4.11 - Perfil de produção de biogás a 50ºC na condição Controle e com efluente previamente hidrolisado com 0,16 e 0,32 U/mL de atividade lipásica: segundo contato do lodo com o efluente.....71
Figura 4.12 - Perfil de produção de biogás a 50ºC na condição Controle e com efluente previamente hidrolisado com 0,16 e 0,32 U/mL de atividade lipásica: terceiro contato do lodo com o efluente.....71
Figura 4.13 - Produção de biogás ao longo do tempo nas condições mesofílica, termofílica e híbrida.....79
Figura 4.14 - Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia na condição termofílica: produção especifica de metano (CNTP) e remoção de DQO ao longo do tempo.....81
Figura 4.15 - Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia na condição mesofílica: produção especifica de metano (CNTP) e remoção de DQO ao longo do tempo.....82
Figura 4.16 - Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia na condição híbrida: produção especifica de metano (CNTP) e remoção de DQO ao longo do tempo.....83

LISTA DE ABREVIAÇÕES:

DBO - Demanda bioquímica de oxigênio

DQO - Demanda química de oxigênio

FES - Fermentação em estado sólido

FS - Fermentação submersa

FSB – Fermentação submersa com 2,5% de babaçu

NKT – Nitrogênio Kjeldahl total

O&G – Óleos e Graxas

PEL - Preparado enzimático líquido

PEM – Produção específica de metano

PES - Preparado enzimático sólido

PT – Fósforo total

SFT – Sólidos fixos totais

SVS – Sólidos voláteis suspensos

SVT – Sólidos voláteis totais

ST – Sólidos totais

STS – Sólidos totais suspensos

1. Introdução e Objetivos

1.1. Introdução

Nas últimas décadas, a preocupação com o ambiente vem crescendo cada vez mais. Torna-se relevante, portanto, para países que visam o seu desenvolvimento, a busca por tecnologias verdes que permitam o crescimento econômico sem causar distúrbios ambientais. Neste contexto, a tecnologia enzimática surgiu como uma alternativa e vem, progressivamente, alcançando um patamar de grande importância, tanto nos processos industriais quanto no tratamento dos efluentes provenientes destes (DUARTE, 2012).

Normalmente, a produção de enzimas de interesse industrial é feita por fermentação submersa (FS), o que torna o custo destas enzimas alto, uma vez que este sistema produtivo utiliza, geralmente, equipamentos de alta tecnologia e gera produtos menos concentrados (MITCHELL et al., 2002; SINGHANIA et al., 2010). Desta forma, torna-se necessário o estudo de alternativas à produção destas enzimas, como, por exemplo, a fermentação em estado sólido (FES).

A FES pode ser conduzida com resíduos agroindustriais como suporte e substrato para o crescimento dos micro-organismos. Deste modo, a FES seria uma maneira eficaz de produzir enzimas concentradas, reaproveitando resíduos provenientes da agroindústria que, além de diminuírem o custo total do processo, são biodegradáveis, o que possibilita sua aplicação direta no tratamento de efluentes (KRISHNA, 2005; VALLADÃO, 2009).

Dentre os biocatalisadores mais estudados, destacam-se as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) pertencentes a um grupo de enzimas que atuam geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de triacilgliceróis (SHARMA et al., 2001). A aplicação destas enzimas vem crescendo progressivamente no meio industrial, por serem capazes de catalisar uma ampla gama de reações, dentre estas a hidrólise de óleos e gorduras em efluentes provenientes de indústrias alimentícias como, por exemplo, as indústrias de processamento e conserva de pescado, foco do presente trabalho.

O consumo global de pescado dobrou desde 1973, sendo os países em desenvolvimento os maiores responsáveis por este aumento (CHOWSHURY et al., 2009). Desde o ano 2000 a produção pesqueira no Brasil, tanto proveniente de aquicultura quanto de pesca extrativa, aumentou significativamente (MINISTÉRIO da PESCA e AGRICULTURA, 2010). Esta crescente demanda por produtos pesqueiros na costa brasileira gera uma série de distúrbios ao meio ambiente, desde a pesca predatória até a geração, após o processamento industrial do pescado, de despejos impróprios ao descarte direto.

Os despejos gerados a partir do processamento do pescado se caracterizam por apresentarem valores elevados de vazão, demanda química de oxigênio (DQO), óleos e graxas e sólidos suspensos totais. Outra característica destes despejos são as elevadas temperaturas devido às etapas de limpeza, cozimento e pasteurização. Geralmente, tais efluentes são descartados nos corpos d'água após tratamento incompatível com seu grau de poluição, o que agrava, por sua vez, os danos ambientais (ROLLÓN, 1999; SILVA e BATISTA, 2003).

Os despejos de indústrias de pescado contêm altas concentrações de lipídios e proteínas (GONZÁLEZ, 1996; LUCAS et.al., 2000; ROLLÓN, 2002), que apresentam baixas taxas de biodegradação. Tratamentos físico-químicos, como a coagulação/floculação com coagulantes químicos como cloreto férrico ou sulfato de alumínio, promovem a separação de gorduras e proteínas, possibilitando uma remoção parcial da matéria orgânica. Porém, apresentam alguns problemas como o elevado custo dos produtos químicos; a remoção parcial da gordura emulsionada ou dissolvida; e lodos impróprios para descarte (LUCAS et. al., 2000).

As gorduras removidas por flotação auxiliada por coagulantes e polieletrólitos constituem quantidades consideráveis de resíduos, que devem ser incinerados ou descartados em aterros sanitários. Tal procedimento acarreta um custo muito elevado para a indústria e para o ambiente, uma vez que reduz a vida útil dos aterros, que rapidamente chegam à sua idade madura, e contamina a atmosfera com os gases gerados durante a digestão anaeróbia dos resíduos, dificultando e, portanto, inviabilizando o processo (LUCAS et al., 2000).

Além disso, os efluentes provenientes de indústrias de processamento de pescado contêm altas concentrações de material orgânico facilmente assimilável em sua composição, o que possibilita e favorece a utilização de processos biológicos de tratamento (ROLLÓN, 1999).

Os processos biológicos podem ser aeróbios ou anaeróbios. Embora os primeiros sejam tradicionalmente empregados, os processos anaeróbios vêm obtendo destaque, ultimamente, devido às vantagens apresentadas sobre os aeróbios, como a de serem potenciais geradores de energia – metano – e a de serem utilizados para degradar a matéria orgânica de efluentes de "alta carga" – DQO maior que 4000 mg/L – diferentemente dos aeróbios que são indicados para o tratamento de efluentes de "baixa carga" – DQO abaixo de 1000 mg/L (CHERNICHARO, 2007; CHAN et al., 2009).

O tratamento anaeróbio, no entanto, é prejudicado com a presença de elevadas concentrações de óleos e graxas, pois podem gerar aglomerados ou ainda *pellets* entre os flocos de lodo, dificultando a sedimentação e, além de emitirem odores desagradáveis, reduzem a eficiência do tratamento anaeróbio (ECKENFELDER, 2000).

Assim, este trabalho apresenta uma proposta inovadora para o tratamento de efluentes provenientes de indústrias de pescado, pois, aproveita-se da alta temperatura na qual o efluente é gerado para implementar uma hidrólise de curta duração. Na etapa de hidrólise, empregou-se um *pool* de enzimas rico em hidrolases termofílicas obtidas por processo de fermentação em estado sólido (FES). A FES apresenta custo bastante reduzido, uma vez que o meio de cultivo é constituído por um resíduo agroindustrial. A fermentação no estado sólido permite, também, uma série de vantagens como, por exemplo, a utilização do preparado enzimático sólido (PES) diretamente no efluente sem que para isto sejam necessários gastos com a extração e/ou recuperação das enzimas dos sólidos fermentados, além de atribuir valor a um resíduo que antes seria descartado.

A utilização do pré-tratamento enzimático termofílico permitirá uma melhor atuação da população microbiana em uma etapa posterior de tratamento biológico, uma vez que evitará o acúmulo de gorduras no lodo. O pré-tratamento possibilita, portanto, a conversão de compostos orgânicos complexos na forma de gorduras e proteínas, antes descartadas como

resíduos sólidos problemáticos, em metano, o qual pode ser aproveitado como fonte de energia na própria indústria.

Por ser uma forma promissora para a redução da carga orgânica complexa de efluentes da indústria de pescado e seus derivados, o pré-tratamento enzimático necessita que se definam as condições operacionais ideais para uma aplicação eficaz. Sendo assim, além de atribuir valor tecnológico a um resíduo agroindustrial, no caso a torta de babaçu, pode-se possibilitar o tratamento de efluentes com alto teor de gordura, provenientes das indústrias de pescado, diminuindo os custos e proporcionando o desenvolvimento do setor econômico e a manutenção e melhoria do setor ambiental.

1.2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o tratamento biológico anaeróbio de efluente de indústria de pescado com e sem uma etapa preliminar de hidrólise enzimática dos O&G presentes no efluente, sendo ambas as etapas (hidrólise e biológica) conduzidas sob condições termofílicas.

Para tal, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Produzir um efluente sintético com características similares ao efluente proveniente de indústria de pescado;
- Estudar os perfis de produção de ácidos livres durante a hidrólise enzimática da gordura presente no efluente de indústria de pescado utilizando diferentes concentrações de enzima (0; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,67 U/mL de efluente) e tempos de reação (0; 4; 8; 12; 16; 20 e 24 horas) a 50ºC;
- Avaliar a biodegradabilidade anaeróbia do efluente de indústria de pescado sem e com o pré-tratamento enzimático, determinando as condições e tempo de reação ideais para o tratamento a 50ºC;
- Avaliar o tratamento biológico a 30°C e 50°C após tratamento enzimático termofílico.
- Comparar resultados obtidos nos tratamentos enzimático/biológico a 30ºC e 50ºC.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Panorama geral da produção e consumo de pescado

A indústria de pescado utiliza uma vasta gama de espécies para a elaboração de produtos comestíveis, variando desde peixes, moluscos, crustáceos a até mesmo anfíbios (BRASIL, 1984a).

A produção mundial de pescado apresentou um grande aumento nos últimos anos. No ano de 2008, a produção mundial atingiu cerca de 142 milhões de toneladas e no ano de 2009 chegou a 146 milhões de toneladas. No ano de 2008, o Brasil contribuiu com 0,81% da produção mundial. No ano de 2009, a China foi o maior produtor, contribuindo com aproximadamente 60,5 milhões de toneladas, seguida da Indonésia com 9,8 milhões de toneladas, da Índia com 7,9 milhões de toneladas e do Peru, que contribuiu com aproximadamente 7 milhões de toneladas (MINISTÉRIO da PESCA e AQUICULTURA, 2010).

O Brasil, no ano de 2009, contribuiu com 1.240.813 toneladas, que representam 0,86% da produção mundial. Esta pequena elevação (0,05%) de 2008 para 2009, fez com que o Brasil subisse 4 colocações no *ranking* mundial de produção de pescado, atingindo o 18° lugar (Tabela 2.1). Em 2010, o Brasil aumentou sua produção para 1.264.765 toneladas, o que corresponde a um aumento de 2% comparado à produção de 2009. Desta quantia, cerca de 536.455 toneladas (42,4% do total) correspondem à pesca extrativa marinha, que continua sendo a maior fonte da produção brasileira de pescado. As outras porções são divididas em aquicultura continental, pesca extrativa continental e aquicultura marinha, que correspondem, respectivamente, a 31,2; 19,7 e 6,7% da produção total brasileira de pescado (MINISTÉRIO da PESCA e AQUICULTURA, 2010).

Tabela 2.1 Produção pesqueira mundial nos anos de 2008 e 2009.

Posição	País	2008		2009	
		Produção	%	Produção	%
1º	China	57.827.108	40,64%	60.474.939	41,68%
2º	Indonésia	8.860.745	6,23%	9.815.202	6,76%
3º	Índia	7.950.287	5,59%	7.845.163	5,41%
4º	Peru	7.448.994	5,23%	6.964.446	4,80%
5º	Japão	5.615.779	3,95%	5.195.958	3,58%
6º	Filipinas	4.972.358	3,49%	5.083.131	3,50%
7º	Vietnã	4.585.620	3,22%	4.832.900	3,33%
8º	Estados Unidos	4.856.867	3,41%	4.710.453	3,25%
9º	Chile	4.810.216	3,38%	4.702.902	3,24%
10º	Rússia	3.509.646	2,47%	3.949.267	2,72%
11º	Mianmar	3.168.562	2,23%	3.545.186	2,44%
12º	Noruega	3.279.730	2,30%	3.486.277	2,40%
13º	Coréia do Sul	3.358.475	2,36%	3.199.177	2,20%
14º	Tailândia	3.204.293	2,25%	3.137.682	2,16%
15º	Bangladesh	2.563.296	1,80%	2.885.864	1,99%
16º	Malásia	1.757.348	1,23%	1.871.971	1,29%
17º	México	1.745.757	1,23%	1.773.644	1,22%
18º	Brasil	1.156.423	0,81%	1.240.813	0,86%
19º	Marrocos	1.003.823	0,71%	1.173.832	0,81%
20º	Espanha	1.167.323	0,82%	1.171.508	0,81%

Fonte: modificada de MINISTÉRIO da PESCA e AQÜICULTURA, 2010.

Segundo o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MIDIC) e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o consumo per capita aparente* do Brasil vem crescendo nos últimos anos, chegando, em 2010, ao valor de 9,75 kg por habitante. Este aumento representa 8% a mais do que o obtido no ano anterior, como pode ser observado na Figura 2.1. Além disso, o objetivo é fazer com que este consumo chegue ao consumo mínimo recomendado pela Organização Mundial da Saúde, que é de 12 kg por habitante/ano (MPA, 2013).

No Brasil, o aumento no consumo de pescado deve-se, principalmente, a mudanças nos hábitos alimentares dos brasileiros, que têm por costume consumir carne bovina e de frango. Porém, há uma tendência do consumo de pescado aumentar cada vez mais, seja pelo seu potencial nutritivo ou ainda pela sua facilidade de comercialização (NICOLUZZI, 1998; DELGADO et al., 2003).

* Consumo per capita aparente (CPA) = (produção + importação – exportação)/população.

Além disso, vale ressaltar que o ano de 2003 foi marcante pela criação da Secretaria Especial de Agricultura e Pesca (SEAP), hoje Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) que, em conjunto com o Ministério do Meio ambiente (MMA), promoveu políticas públicas que reforçaram o setor pesqueiro nacional e aumentou a produção pesqueira no país (MPA, 2010).

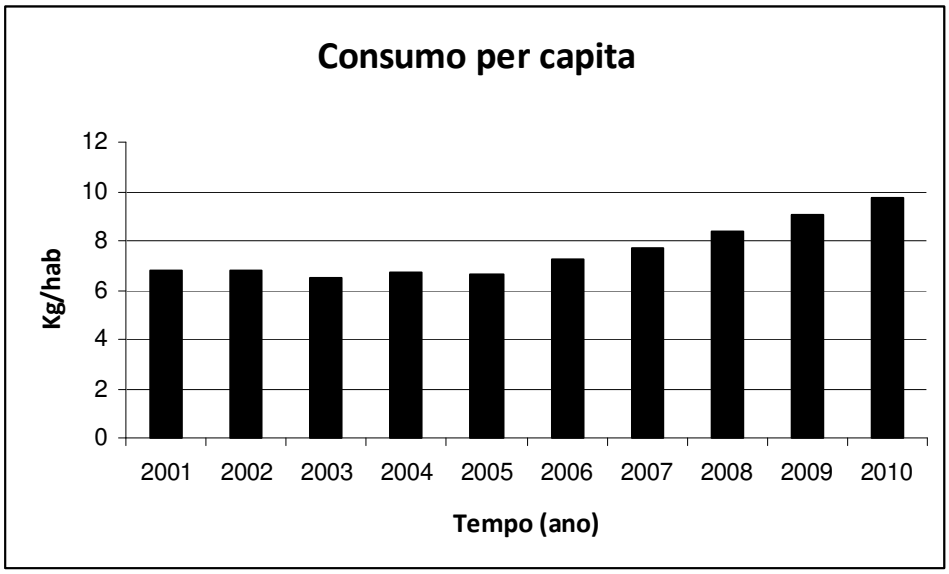

Figura 2.1: Consumo per capita aparente no Brasil de 2001 até 2010 (Fonte MIDIC e IBGE, 2010– elaboração própria).

Analisando a Figura 2.1, percebe-se que o consumo de pescado aumentou quase que linearmente desde 2005. Este consumo tende a aumentar mais nos próximos anos, em função de incentivos do governo como o "Programa Mais Peixe" e a "Feira do Peixe" na região Centro-sul do Brasil. Tais programas têm como objetivo aumentar o consumo de peixe em todo o país (Portal do estado do Rio Grande do Sul, 2013).

Uma estimativa para o ano de 2020 é de que o consumo per capita aumente em países em desenvolvimento, chegando a 16,2 kg/hab/ano e continue aumentando conforme o crescimento do país (DELGADO et al., 2003).

2.2. Impactos ambientais causados por efluentes de indústrias de pescado

Atualmente, há uma grande preocupação com o ambiente devido ao uso exacerbado e indevido da natureza. O aumento da população mundial gera concomitantemente o aumento do consumo de alimentos e da produção de efluentes provenientes das indústrias produtoras de alimentos, como é o caso das indústrias produtoras de pescado.

As fontes de água são objeto de proteção ambiental por serem um recurso natural essencial à vida. Sendo assim, o despejo exacerbado de efluentes nos corpos d'água, sem que recebam o devido tratamento para estarem nas condições exigidas pela legislação, pode causar uma alteração na qualidade da água e, portanto, no ecossistema local. Tal distúrbio ambiental pode não ser revertido pela falta de capacidade de autodepuração para absorver tamanha carga orgânica.

Com o excesso de carga orgânica há a multiplicação de micro-organismos aeróbios consumidores de matéria orgânica, o que leva à diminuição da quantidade de oxigênio disponível nos corpos d'água. Além disso, muitos efluentes, como os da indústria de pescado, contêm óleos e graxas que, por formarem um filme na superfície do líquido, impedem a difusão do oxigênio presente no ambiente para os corpos d'água prejudicando, desta forma, tanto a flora quanto a fauna do ecossistema local (AGUIAR, 1987; SILVA e BATISTA, 2003; SHIH et al., 2003; CHOWDHURY et al., 2010).

O processamento de pescado gera grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos. Normalmente, cerca de 45% do material bruto acaba por não ser utilizado, sendo despejado nos corpos receptores (EL-BELTAGY et al., 2005; RAÍ et al., 2010).

Assim como a maioria das indústrias de processamento, as operações realizadas no processamento de pescado produzem um efluente rico em contaminantes orgânicos na forma solúvel, particulada ou coloidal. As formas de processamento do pescado variam de acordo com as indústrias, sendo as mais comuns as que consistem em "filleting", congelamento, secagem, fermentação, acondicionamento em latas e defumação (ROLLON, 1999). Cada etapa do processamento gera diferentes efluentes nomeados de "água para

descarte” ou “descarte de água”. Tais descartes podem conter muito sangue em sua composição, proveniente da evisceração ou ainda da limpeza dos peixes para produção de filés, sendo denominados de “águas de sangue” (CHOWDHURY et al., 2010).

A maior parte destas “águas para descarte” são geradas logo após etapas de secagem e evaporação. Além disso, há também o descarte após a remoção de óleo por meio do evaporador (CHOWDHURY et al., 2010). Tal fato indica que os efluentes gerados, se não tratados adequadamente, podem ser descartados com elevadas temperaturas e com altos índices de óleos e graxas nos corpos receptores.

A contaminação dos corpos receptores varia de acordo com o efluente gerado nas operações, podendo ter pequeno (como no caso das águas de lavagem, médio (como no caso do efluente gerado na produção de filés de peixe - “filleting”) e grande impacto (como as “águas de sangue” drenadas dos tanques de estocagem de peixe) (GONZALEZ, 1996; CHOWDHURY et al., 2010).

O tratamento dos resíduos sólidos e líquidos vem surgindo como uma das maiores preocupações, não somente nas indústrias de processamento de pescado, mas também nas indústrias produtoras de carnes em geral. Tal preocupação se deve ao aumento do rigor da legislação ambiental, associado à conscientização da população consumidora de seus produtos e ao elevado custo de tratamento dos efluentes (SALMINEM e RINTALA, 2002; INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION, 2006).

De forma geral, os processos industriais são acompanhados pela produção de quantidades elevadas de efluentes que representam um grande risco ao ambiente. Desta forma, é de extrema importância que se desenvolvam tecnologias que possibilitem melhor recuperação do material orgânico presente nestes resíduos como uma forma de mitigar a poluição causada pelo descarte inapropriado dos efluentes (QUITAIN et al., 2001).

2.3. Efluentes gerados nas indústrias de pescado

2.3.1. Caracterização

Os efluentes gerados nas indústrias de pescado diferem muito de uma indústria para outra ou até mesmo ao longo do tempo dentro de uma mesma indústria. Tal variação é função do tipo de pescado utilizado, da fase do processamento ou ainda das alterações sofridas na fase inicial de coleta do pescado (ARGENTA, 2012).

Além disso, ao longo das diversas etapas de processamento do pescado, diferentes "águas para descarte" são geradas. Nas indústrias, em geral, são adicionados aos efluentes gerados no processamento as águas de lavagens do pescado, as águas de lavagens de pisos e equipamentos, e ainda são incluídos nesses efluentes os esgotos sanitários dos funcionários. Tais operações geram grandes volumes de resíduos sólidos e líquidos, porém, a maior parte dos resíduos sólidos é removida no próprio sistema produtivo ou no gradeamento e peneiramento das águas residuárias (SILVA e BATISTA, 2003).

Os efluentes gerados nas indústrias de processamento de pescado variam sua composição de acordo com a constituição do peixe utilizado, a época do ano, os aditivos utilizados durante o preparo das conservas, a fonte de água empregada e a própria forma de operação da unidade de processamento. De forma geral, os efluentes são compostos principalmente de cabeças, vísceras, ossos e escamas e apresentam elevadas vazão e concentração de matéria orgânica biodegradável constituída principalmente de proteínas e lipídios (GONZALEZ, 1996; LUCAS et al., 2000; ROLLÓN, 2002; BERGE, 2007; RAÍ et al., 2010).

Rollón (1999) fez um levantamento de diversos efluentes de indústrias processadoras de atum e sardinha e verificou, como pode ser observado na Tabela 2.2, que os efluentes apresentam as seguintes faixas de variação: pH (5,6 - 7,2), DBO – demanda bioquímica de oxigênio (710 - 14500 mg/L), DQO – demanda química de oxigênio total (1500 - 53600 mg/L), DQO solúvel (1250 - 52100 mg/L), sólidos totais (550 - 12400 mg/L) e NKT – nitrogênio Kjeldahl total (82 - 703 mg/L).

Outra característica de suma importância é a temperatura em que estes efluentes são gerados. Segundo Lema et al. (1987), a temperatura dos efluentes de indústrias que processam mexilhão é entre 80-90℃, devido à submissão destes animais ao vapor para abertura de suas conchas. Nas demais indústrias de processamento de pescado este fato não é diferente, pois pode-se observar diversas etapas que levam ao aumento da temperatura do efluente como as de evaporação, autoclavação e cozimento. No levantamento realizado por Rollon (1999), existem poucos dados de temperatura, mas percebe-se que há uma grande variação na temperatura, que chega a 45ºC em um dos estudos.

Atualmente, existe uma variedade de tecnologias que se aplicam ao tratamento desses efluentes. Os tratamentos físico-químicos, com adição de coagulantes químicos (como sulfato de alumínio e cloreto férrico), permitem uma remoção parcial da matéria orgânica devido à separação de proteínas e gorduras. No entanto, o custo com produtos químicos é elevado, a gordura dissolvida ou emulsionada não é removida de forma eficiente e lodos extremamente problemáticos para tratamento e descarte são produzidos (LUCAS et al., 2000). Sendo assim, os processos biológicos acabam sendo empregados, em grande parte dos casos, destacando-se os processos biológicos anaeróbios, que vêm sendo largamente utilizados no tratamento de efluentes da indústria de pescado em função de sua elevada carga orgânica biodegradável (ROLLÓN, 1999).

Tabela 2.2: Caracterização dos efluentes de pescado.
Fonte ROLLÓN (1999) *apud* VALENTE, 2009.

PESCADO	PAÍS	T (°C)	pH	DBO (g/L)	DQO (g/L)		SVS/STS	NH_3-N/NKT
					TOTAL	SOLÚVEL		
SARDINHA	EUA	nd	nd	1,3 (52)	2,5	nd	nd/0,92	nd/nd
SARDINHA	Filipinas	25-26	6,9	7,0 (52)	13,5	1,25 (9)	4,74/4,89	130/430
SARDINHA	Filipinas	26	6,5	nd	5,8	1,52 (26)	nd/1,58	nd/390
ATUM/ SARDINHA	Filipinas	30	7	9,0 (64)	14,1	4,0 (28)	nd/3,85	nd/400
ATUM/ SARDINHA	Filipinas	30	nd	14,5 (57)	25,6	nd	nd/11,14	nd/nd
ATUM/ SARDINHA	Filipinas	nd	6,5	nd	6,2	1,8	nd/1,69	nd/350
ATUM/ SARDINHA	Tailândia	nd	6,5-6,8	3,0-4,2 (66)	4,8-6,4	nd	nd/0,75-1,4	nd/250
ATUM/ SARDINHA	Brasil	nd	6,3-6,4	4,1-6,4 (63)	6,5-10,2	nd	nd/1,7-2,7	44/390
ATUM	Espanha	45	nd	nd	34,5	nd	3,6/4,0	nd/nd
ATUM	Espanha	nd	5,6-6,6	nd	20-53,6	19,7-52,1	1,9/2,0	200-6900/nd
ATUM	Tailândia	nd	6,4-6,6	0,8-7,5	1,5-10,6	nd	1,4-6,7/5-12,4	nd/126-703
ATUM	EUA	nd	6,2-7,2	0,71	1,9	nd	nd/0,55	6/82

T (°C) – temperatura; DBO – demanda bioquímica de oxigênio; DQO – demanda química de oxigênio; SVS – sólidos voláteis suspensos; STS – sólidos totais suspensos; NKT – nitrogênio Kjeldahl total; nd = não determinado.

2.3.2. Legislação ambiental

A Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento, conhecida também por Rio-92, realizada entre 3 e 14 de junho de 1992 no Rio de Janeiro, foi a primeira conferência a consagrar o conceito de desenvolvimento sustentável, justamente por ter sido resultado da busca pela conciliação do desenvolvimento socioeconômico com a conservação e proteção dos ecossistemas do nosso planeta e neste contexto entra a proteção do recurso natural que integra as preocupações do desenvolvimento sustentável: a água (ONU BRASIL, 2013).

O controle da poluição dos corpos d'água está diretamente relacionado à proteção da vida por garantir um meio ambiente ecologicamente equilibrado, proteção da saúde e, portanto, a melhoria da qualidade de vida. Sendo assim, com o objetivo de defender e preservar os corpos d'água do nosso país, a Constituição Federal e a Lei n° 6938 de 31 de Agosto de 1981, visam controlar o lançamento no meio ambiente de poluentes, proibindo o lançamento em

níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida (CONAMA, 2005).

A Resolução CONAMA 357, de 17 de Março de 2005, modificada pela Resolução 397, de 03 de Abril de 2008 e pela Resolução 430, de 13 de Maio de 2011, todas incorporadas na nossa legislação federal, dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos d'água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes.

Estas Resoluções versam sobre o lançamento de efluentes direta ou indiretamente aos corpos d'água, depois de seu devido tratamento, a fim de atingir as metas estabelecidas por esta e em outras normas que também sejam aplicáveis a este caso. Desta forma, o lançamento e a autorização do lançamento de efluentes em desacordo com as condições estabelecidas pela Resolução supracitada são vedados, à exceção de serem autorizados pelo órgão ambiental competente, no caso do Rio de Janeiro, o INEA (Instituto Estadual do Ambiente, antiga FEEMA).

Desta forma, algumas das condições padrão atuais, estabelecidas na Resolução 430 de 2011, que devem ser respeitadas para a realização do descarte dos efluentes nos corpos d'água são:

- pH entre 5 e 9;
- Temperatura inferior a 40°C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C no limite da zona de mistura ;
- Materiais sedimentáveis até 1mL/L em teste de 1 hora em cone *Imhoff.* Devendo estes serem virtualmente ausentes no caso de lançamento em lagos ou lagoas;
- regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vez a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente;
- Óleos e graxas minerais até 20mg/L e vegetais ou animais até 50mg/L;
- Ausência de materiais flutuantes;
- Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO 5 dias a 20°C): remoção mínima de 60% de DBO sendo que este limite só poderá ser reduzido no caso de existência de estudo de autodepuração do corpo hídrico que comprove atendimento às metas do enquadramento do corpo receptor;

- O efluente não deverá causar ou possuir potencial de causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

No âmbito estadual, no Rio de Janeiro há a Norma Técnica NT–202, publicada no DOERJ em Dezembro de 1986 pela antiga FEEMA, atual INEA, que estabelece critérios de lançamento direto ou indireto de efluentes líquidos em águas costeiras, superficiais ou subterrâneas do Estado do Rio de Janeiro, não sendo permitida a diluição dos efluentes para enquadramento nos critérios estabelecidos. Tal Norma Técnica segue os padrões determinados pela legislação federal com exceção ao limite exigido para o descarte de efluentes contendo óleos e graxas de origem animal, que deve conter no máximo 30 mg O&G/L (NT – 202. R-10 / 1986).

Os limites de lançamento para cargas orgânicas, no entanto, são descritos pela Diretriz específica DZ–205. R-6 de 2007, que estabelece exigências de controle de poluição das águas como parte integrante do Sistema de Licenciamento de Atividades Poluidoras (SLAP), que consistem na redução de material orgânico biodegradável e não biodegradável de origem industrial e de compostos orgânicos também de origem industrial que de alguma forma interfiram nos processos ecológicos naturais dos corpos d'água receptores e nos sistemas de tratamento de efluentes implantados pelas indústrias e operadoras de serviços de esgoto (DZ – 205. R-6 / 2007).

Esta Diretriz estabelece valores mínimos de remoção de DBO com base na vazão e carga de DBO do efluente bruto gerado na unidade industrial. E estabelece também valores máximos de DQO como um acréscimo à legislação federal e a Norma Técnica de referência desta diretriz. A DQO que pode ser lançada nos corpos d'água, no caso das indústrias de pescado, deverá ser menor que 500mg/L ou 10 kg/dia para atender à legislação brasileira de descarte de efluentes líquidos (DZ – 205. R-6 / 2007).

2.3.3. Tratamento de efluentes

Os despejos gerados a partir do processamento do pescado se caracterizam por apresentarem tanto matéria orgânica em suspensão quanto dissolvida, altos níveis de lipídios e proteínas, altos teores de DQO, óleos e graxas e sólidos suspensos totais. E são originados em elevadas vazões e temperaturas devido às etapas de limpeza, cozimento e pasteurização. Assim, apenas o tratamento primário pode não ser suficiente para atingir os padrões exigidos pelos órgãos ambientais (GONZÁLEZ, 1996; ROLLÓN, 1999; LUCAS et al., 2000, ROLLÓN, 2002; SILVA e BATISTA, 2003).

Considerando os diversos tipos de tratamentos de efluentes utilizados, pode-se dizer que primeiramente há uma separação entre os tratamentos físicos e/ou químicos dos biológicos.

Os tratamentos físico-químicos, como coagulação/floculação com a utilização de coagulantes químicos como cloreto férrico ou sulfato de alumínio, promovem a separação de gorduras e proteínas, possibilitando a remoção parcial da matéria orgânica (RUSTEN et al.,1993; LUCAS et al., 2000). Porém, o tratamento químico pode gerar alguns problemas como a remoção parcial da gordura emulsionada ou dissolvida, além da remoção ineficiente de DQO, lodos impróprios para descarte e o elevado custo dos produtos químicos (LUCAS et al., 2000). Sendo o custo um dos principais fatores a serem considerados no tratamento de efluentes, uma vez que este é realizado, na maioria das vezes, devido ao maior rigor da legislação ambiental vigente.

Segundo Chernicharo (1997), em uma adaptação feita aos trabalhos de Von Sperling (1995) e Lettinga (1995), os principais requisitos que devem ser observados na escolha das plantas de tratamento de efluentes devem ser:

- Baixo custo de implementação;
- Elevada sustentabilidade do sistema;
- Simplicidade operacional, de manutenção e de controle;
- Baixos custos operacionais;
- Adequada eficiência de remoção das mais diversas categorias de poluentes;
- Pouco ou nenhum problema com a disposição do lodo gerado na estação;

- Baixos requisitos de área;
- Existência de flexibilidade em relação às expansões futuras e ao aumento de eficiência;
- Possibilidade de aplicação em pequena escala;
- Poucas unidades integrando a estação;
- Elevada vida útil;
- Ausência de problemas que causem transtorno à população vizinha;
- Possibilidade de recuperação de subprodutos úteis; e
- Existência de experiência prática.

Os efluentes provenientes de indústrias de processamento de pescado contêm altas concentrações de material orgânico facilmente assimilável em sua composição, o que possibilita e favorece a utilização de processos biológicos, sendo estes os mais adequados, dentre os demais, para tratar efluentes nestas condições.

Os processos biológicos apresentam diversas vantagens quando comparados aos tratamentos químicos, como o menor custo quando comparados aos processos físico-químicos, a possibilidade de transformação da matéria orgânica presente no efluente em gás carbônico e água e os micro-organismos responsáveis pelo processo podem ser mantidos ativos desde que se mantenham condições próprias para sua manutenção e crescimento (PAYNE, 1997).

Os processos biológicos podem ser aeróbios ou anaeróbios. Embora os primeiros sejam tradicionalmente empregados, os processos de tratamento anaeróbio ultimamente vêm obtendo destaque devido às vantagens apresentadas sobre os aeróbios. Dentre as vantagens, pode-se citar a de serem potenciais geradores de energia através da produção de metano e a de serem utilizados para degradar a matéria orgânica de efluentes de “alta carga”, chamados desta forma por possuírem DQO maior que 4000 mg/L, diferentemente dos aeróbios que são indicados para o tratamento de efluentes de “baixa carga”, cuja DQO é menor que 1000 mg/L (CHERNICHARO, 2007; CHAN et al., 2009).

Na Figura 2.2, pode-se observar um esquema de comparação entre os tratamentos biológicos aeróbios e anaeróbios. No sistema aeróbio há somente cerca de 40 a 50% de conversão da matéria orgânica a gás carbônico (CO_2). De 30 a 40% do material orgânico é convertido em biomassa, cujo excedente se constituirá o chamado lodo de excesso, posteriormente descartado do sistema. O restante da matéria orgânica será descartada como material não degradado, o que corresponderia a 5 a 15% (CHERNICHARO, 2007). Por outro lado, ainda na Figura 2.2, é possível observar também o funcionamento de um reator anaeróbio no qual a maior parte do material orgânico é convertido em gás metano (de 50 a 70%), uma pequena porção é convertida em biomassa, de 5 a 15%, que constituirá o lodo excedente do sistema, e a parte não consumida pelos micro-organismos componentes do lodo, cerca de 10 a 30%, será descartada como material não degradado (CHERNICHARO, 2007).

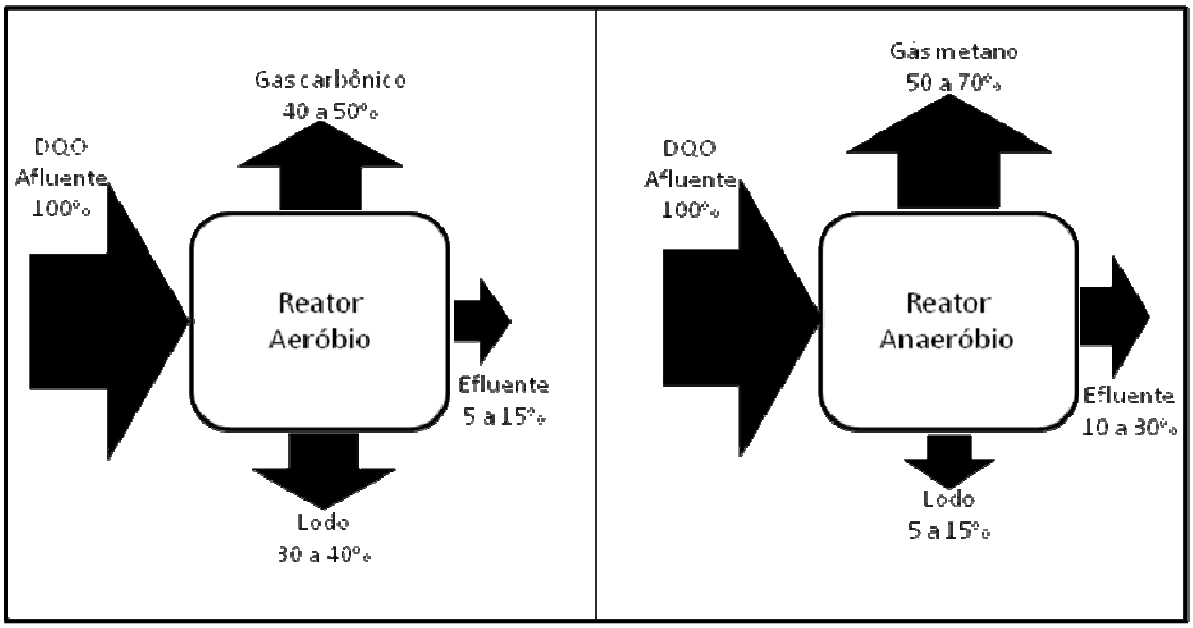

Figura 2.2: Esquema do balanço de DQO em reatores aeróbios e anaeróbios (CHERNICHARO, 2007).

Devido a estas características, o tratamento biológico selecionado para a realização deste trabalho foi o tratamento anaeróbio que, portanto, será mais explorado no tópico seguinte.

2.3.4. Tratamento biológico anaeróbio

Os sistemas anaeróbios são recomendados para uso no tratamento de efluentes industriais devido aos elevados índices de material orgânico facilmente degradável (CHEN et al., 2008). Justamente por isso os sistemas anaeróbios são ditos apropriados para o tratamento dos efluentes de indústrias de processamento de pescado (JOHNS, 1995).

Porém, o tratamento biológico anaeróbio, como todo processo, possui características que são favoráveis e desfavoráveis à sua implementação. Dentro do conjunto de características favoráveis é possível destacar: baixa produção de sólidos; baixo consumo de energia; baixos custos de implantação e operação; baixos requisitos de área; produção de biogás contendo metano – potencial biocombustível; tolerância a elevadas cargas orgânicas e possibilidade de operação com elevados tempos de retenção de sólidos e baixos tempos de retenção hidráulica, que conferem ao tratamento biológico anaeróbio a possibilidade de tratamento de efluentes tanto concentrados como diluídos (CHERNICHARO, 2007; CHOWDHURY et al., 2010).

As desvantagens de implementação dos sistemas de tratamento anaeróbio estão na remoção insatisfatória de nutrientes – nitrogênio e fósforo - e patógenos, além da instabilidade dos reatores anaeróbios devido a choques de carga orgânica, e à presença de compostos potencialmente tóxicos ou ainda à falta de nutrientes. Além disso, os valores de DQO no efluente dos reatores anaeróbios, na maioria das vezes, são superiores aos padrões de descarte estabelecidos na legislação, exigindo-se um pós-tratamento ou polimento do efluente (CHERNICHARO, 2007).

2.3.4.1. Fundamentos da digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia tem crescido nos últimos anos por se tratar de uma tecnologia sustentável e ambientalmente segura para o tratamento de efluentes e transformação de matéria orgânica em biogás (mistura de metano e dióxido de carbono). Neste processo, os micro-organismos trabalham

interativamente na conversão da matéria orgânica e na multiplicação celular, em ambientes livres de oxigênio. A digestão de substâncias complexas presentes no efluente compreende uma série de processos bioquímicos sequenciais (SANT'ANNA JR., 2010).

A digestão anaeróbia funciona em uma sequência, na qual diversos micro-organismos participam e cada um tem a sua função pré-determinada dentro do ciclo de degradação do material orgânico até a formação do biogás (gás carbônico, metano e vapor d'água). A Figura 2.3 mostra como funciona este processo.

Na Figura 2.3, nota-se que os micro-organismos que participam do processo de digestão anaeróbia podem ser divididos em três grupos principais, segundo Chernicharo (2007):

1. Grupo das bactérias fermentativas, que, através da hidrólise, transformam macromoléculas como os carboidratos, proteínas e lipídios, em moléculas orgânicas simples como açúcares, aminoácidos e peptídeos. Estes, por sua vez, serão transformados em ácidos orgânicos de cadeia curta pelas mesmas bactérias fermentativas;

2. Grupo das bactérias acetogênicas, que são responsáveis por transformar os ácidos orgânicos de cadeia curta - produtos gerados pelas bactérias fermentativas - em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono;

3. Grupo das arqueas metanogênicas, que são os micro-organismos responsáveis por utilizar como substrato os produtos finais gerados pelas bactérias acetogênicas, sendo que uma parte deste grupo, as metanogênicas acetoclásticas, utiliza o acetato, transformando-o em metano e dióxido de carbono, enquanto o restante, metanogênicas hidrogenotróficas, produz metano através da redução do dióxido de carbono.

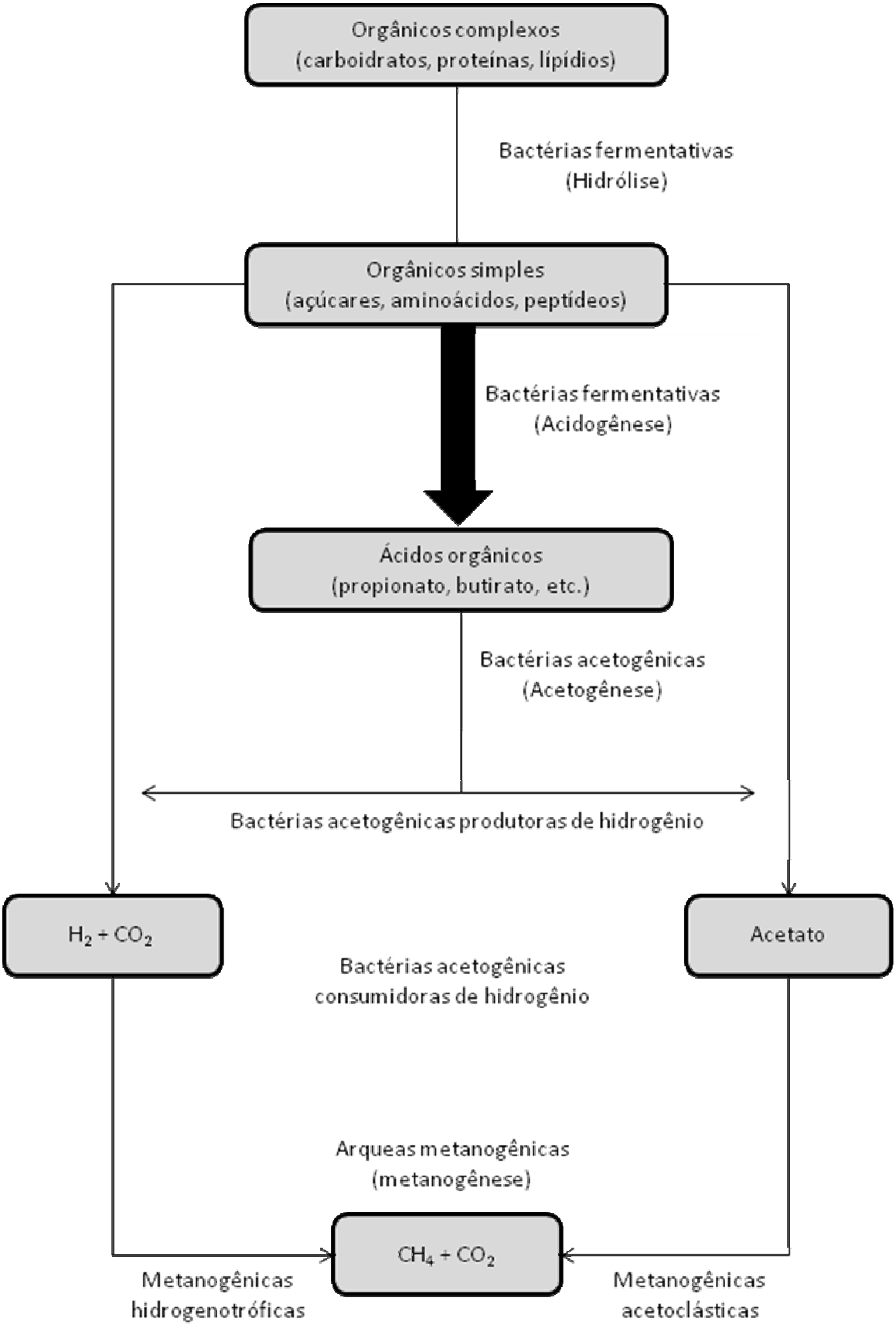

Figura 2.3: Metabolismo e micro-organismos responsáveis pela digestão anaeróbia (CHERNICHARO, 2007).

Todos estes Grupos de micro-organismos estão envolvidos no processo de digestão anaeróbia que, por sua vez, também pode ser dividido em quatro etapas para facilitar o entendimento do processo. São elas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

1. Hidrólise:

Os micro-organismos não são capazes de assimilar moléculas complexas como os carboidratos, proteínas e lipídios, sendo necessária, portanto, a etapa de "quebra" deste material que é feita através da hidrólise. O material orgânico particulado é hidrolisado pela ação de enzimas extracelulares (hidrolases) produzidas por bactérias fermentativas hidrolíticas. Esse material é convertido em compostos orgânicos solúveis capazes de atravessar a parede celular de bactérias fermentativas. Esta etapa ocorre de forma lenta, sendo vários os fatores que podem afetar o grau e a taxa com que o substrato é hidrolisado como, por exemplo, a temperatura de operação do biorreator, composição do substrato, pH do meio, tamanho das partículas, entre outros (LETTINGA et al., 1996).

2. Acidogênese:

Esta etapa ocorre dando sequência à fase anterior, de modo que os compostos solúveis gerados na hidrólise são absorvidos pelas bactérias fermentativas acidogênicas, sendo estes metabolizados no interior das células, convertendo-os em ácidos orgânicos voláteis (principalmente ácido acético, butírico e propiônico). Normalmente as bactérias responsáveis pela hidrólise também participam da etapa de fermentação acidogênica e estas possuem um curto tempo de geração, o que faz com que esta fase não seja limitante no processo de digestão anaeróbia, à exceção dos materiais hidrolisáveis serem de difícil degradação (SCHINK, 1997; CHERNICHARO, 2007).

3. Acetogênese:

Nesta etapa ocorre a conversão dos produtos da hidrólise e acidogênese em compostos que constituem os substratos para formação de metano pelas arqueas metanogênicas: acetato, H_2 e CO_2 (LIMA, 1996 *apud* VALENTE, 2009).

4. Metanogênese:

A metanogênese corresponde à etapa final do processo de digestão anaeróbia dos compostos orgânicos. Este grupo é constituído de micro-organismos anaeróbios estritos, pertencentes ao domínio *Archaea* - as arqueas metanogênicas, presentes na natureza em ambientes como sedimentos anóxicos, pântanos, solos profundos e tratos gastrointestinais de animais (CHERNICHARO, 2007).

As arqueas metanogênicas são divididas em dois grupos principais devido a sua diferente fisiologia: as metanogênicas acetoclásticas, que formam metano através do acetato, e as metanogênicas hidrogenotróficas, que formam metano através de dióxido de carbono e hidrogênio (CHERNICHARO, 2007).

2.3.4.2. Digestão anaeróbia termofílica

O processo de digestão anaeróbia pode ser realizado em três faixas distintas de temperatura: a pscicrofílica - que ocorre de 15 a 20°C; mesofílica - que compreende de 30 a 45°C e termofílica - que corresponde às temperaturas na faixa de 50 a 65°C (LETTINGA et al., 1996).

A digestão anaeróbia termofílica apresenta algumas vantagens quando comparada à digestão anaeróbia mesofílica. Devido ao fato de a temperatura ser mais alta, possivelmente há a elevação da taxa de crescimento dos micro-organismos, assim como há o aumento da taxa de hidrólise de moléculas orgânicas como proteínas e lipídios, o que provavelmente levaria à diminuição

nos custos e tamanho dos reatores. A alta temperatura também possibilita a eliminação total ou parcial de patógenos (bactérias e vírus) e a diminuição de lodo excedente formado durante o processo de digestão (BUHR e ANDREWS, 1977; LO et al., 1985; ROLLÓN, 1999).

No entanto, segundo Buhr e Andrews (1977), a escolha do processo de digestão anaeróbia termofílica também traz algumas desvantagens, tais como a necessidade de maiores gastos energéticos para o aumento e manutenção da temperatura do efluente nos digestores, a redução da estabilidade do processo e da qualidade do efluente devido ao aumento da quantidade de sólidos dissolvidos. Além disso, Massé e Masse (2001) demonstraram que embora a remoção de DQO nos sistemas de digestão termofílica seja mais rápida que em processos mesofílicos, a remoção da matéria orgânica não é uniforme.

O tratamento anaeróbio, no entanto, é prejudicado com a presença de elevadas concentrações de óleos e graxas, pois estes podem gerar aglomerados ou *pellets* entre os flocos de lodo, dificultando a sedimentação e, além de emitirem odores desagradáveis, reduzem a eficiência do tratamento (ECKENFELDER, 2000).

Assim, aproveitando-se da elevada temperatura de descarte dos efluentes provenientes das indústrias de processamento de pescado, a etapa de hidrólise e o tratamento biológico posterior poderiam ser conduzidos a temperaturas dentro da faixa termofílica. Tal procedimento, possivelmente, aumentaria as taxas de hidrólise dos lipídios, diminuindo o teor de óleos e graxas no afluente do reator anaeróbio e melhorando o tratamento biológico posterior.

Desta forma, foi desenvolvido neste trabalho um sistema híbrido de tratamento que associa ambos os tratamentos enzimático e biológico. Para o pré-tratamento enzimático foi utilizado um preparado enzimático sólido (PES), rico em lipases termofílicas e termoestáveis produzidas pelo fungo *Penicillium simplicissimum* (GUTARRA et al., 2009). Esta elevada temperatura de atuação possibilita a utilização direta das enzimas nos efluentes recém-gerados na indústria. O pré-tratamento enzimático tem como objetivo reduzir os níveis de triglicerídios do efluente, tornando-o mais biodegradável e possibilitando aumento na eficiência do tratamento biológico posterior. A alimentação do

efluente previamente hidrolisado no reator anaeróbio permite uma melhor atuação da comunidade microbiana presente no lodo anaeróbio, gerando concomitantemente biogás (metano) que poderá ser utilizado como fonte de energia na própria indústria.

2.4. Enzimas no tratamento de efluentes

O tratamento convencional de efluentes, por vezes, é prejudicado devido à presença de compostos recalcitrantes ou tóxicos na composição dos efluentes. A utilização de enzimas como adicional ao tratamento convencional permite o tratamento específico destes compostos, tornando-os mais biodegradáveis. A utilização de enzimas no tratamento de efluentes tem despertado grande interesse em diversos pesquisadores devido à seletividade destes biocatalisadores, o que permite o ataque específico aos compostos recalcitrantes e tóxicos, aumentando a biodegradabilidade dos efluentes e possibilitando a utilização posterior de tratamentos biológicos.

O uso de enzimas, no entanto, deve seguir alguns critérios para que o tratamento posterior não seja prejudicado. Como por exemplo: a reação deve gerar produtos que sejam mais biodegradáveis e menos tóxicos que os reagentes; a enzima deve ser específica para degradar um dado composto alvo e deve permanecer ativa e estável nas condições de tratamento; os reatores devem ser os mais simples e a enzima tem que ser obtida da forma mais barata possível (AITKEN, 1993).

As enzimas podem ser aplicadas em diversas fases do processo de tratamento de efluentes, tais como (AITKEN, 1993):

- Remoção específica de compostos refratários em efluentes compostos de misturas complexas antes de serem encaminhados para o tratamento biológico;
- Remoção específica de compostos que se encontram em níveis residuais nos efluentes;
- Polimento de efluentes já tratados ou de águas subterrâneas com o objetivo de atingir os padrões de toxicidade exigidos;

- Remoção de compostos específicos de misturas diluídas que não possibilitam o tratamento biológico;
- No tratamento *in-plant* de efluentes com baixos volumes e altas concentrações; e
- No tratamento de efluentes gerados com menor frequência ou em pontos isolados.

As principais enzimas utilizadas no tratamento de efluentes são as peroxidases e as hidrolases (proteases, celulases, amilases e lipases). Dentro do grupo das hidrolases, estão as lipases que, além de diversas aplicações no ramo industrial, são aplicadas com sucesso, em escala laboratorial, no tratamento de efluentes de indústrias de alimentos, tais como: abatedouros de aves, laticínios e pescado (CAMMAROTA e FREIRE, 2006).

Apesar de todas as vantagens conferidas pelas enzimas, sua aplicação no tratamento de efluentes industriais não pode representar aumento significativo nos custos do processo. Desta forma, é crescente a busca por alternativas de produção de enzimas que tornem sua aplicação viável e de baixo custo no tratamento de efluentes industriais.

2.5. Métodos de produção de enzimas

2.5.1. Fermentações

A produção de enzimas utilizadas no tratamento de efluentes deve ser economicamente viável para que não signifique aumento expressivo dos custos do processo. Desta forma, pode-se optar por dois sistemas comuns e convencionais de produção: a fermentação submersa (FS) e a fermentação no estado sólido (FES). Cada um destes sistemas fermentativos possui suas vantagens e desvantagens que serão descritas a seguir.

A fermentação submersa consiste em um processo fermentativo que ocorre em presença de excesso de água, no qual os nutrientes geralmente estão dissolvidos na fase líquida e a quantidade de sólidos não ultrapassa 50 g/L. Este sistema é prioritariamente utilizado para a produção de enzimas em larga escala devido principalmente à facilidade de monitoramento e controle do processo (MITCHELL et al., 2002; SINGHANIA et al., 2010).

Porém, o emprego de equipamentos de alta tecnologia e a geração de produtos menos concentrados aumentam o custo de produção da FS. Desta forma, para utilização no tratamento de efluentes, torna-se necessário o estudo de alternativas à produção destas enzimas como, por exemplo, a fermentação no estado sólido – FES (CASTILHO et al., 2000a).

A FES é utilizada pelos chineses desde 1000 a.C. na obtenção de molho de soja. Além disso, tem um grande histórico de utilização pelos orientais para a produção de bebidas e alimentos fermentados como o *koji*, produzido a partir de arroz, através do crescimento e produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo *Aspergillus oryzae*; o *sake*, produzido através da sacarificação do arroz; e *angkak*, produzido através do crescimento do *Monascus purpurea* em arroz vermelho (MITCHELL et al., 2002; HÖLKER e LENZ, 2005).

A FES consiste em um processo fermentativo no qual os micro-organismos se desenvolvem em meio de cultivo sólido, normalmente composto de resíduos agroindustriais, que funcionam como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento. A FES se dá na ausência ou quase ausência de água livre, sendo a água absorvida na matriz sólida apenas em quantidade suficiente para o crescimento do micro-organismo e não ultrapassando a capacidade de absorção da matriz sólida (KRISHNA, 2005).

Ultimamente, a FES tem demonstrado muitas vantagens quanto à produção de enzimas sobre o processo tradicional utilizado, a FS, o que vem atraindo o interesse de pesquisadores para a produção de diversas enzimas, assim como as hidrolíticas, por FES (MATSUMOTO et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2005; GUTARRA et al., 2009; VINTILA et al., 2009) .

Uma vez que a utilização de água é menor, quando comparada à FS na qual há um excesso de água livre, necessita-se de um menor espaço para os bioreatores e o produto obtido geralmente é de fácil recuperação e está mais concentrado. Além disto, o risco de contaminação por bactérias e leveduras é

menor, devido à baixa quantidade de água no meio e complexidade dos substratos (HÖLKER e LENZ, 2005).

Na FES normalmente são utilizados meios de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, como substrato. Isto se torna uma característica de suma importância, principalmente pelo Brasil possuir forte base agrícola e, portanto, uma elevada produção de resíduos provenientes da agroindústria (PANDEY, 2003; KRISHNA, 2005; MAMMA et al., 2008).

Muitos estudos têm sido feitos comparando os dois métodos fermentativos quanto à produção de enzimas, e na maioria dos casos a FES tem sido apontada como o melhor sistema fermentativo (SANDHYA et al., 2005; PATIL e DAYANAND et al., 2006). Possivelmente, devido às condições de estresse ao qual o micro-organismo é submetido na FES, que seriam responsáveis pela maior produção de esporos, maior crescimento e maior produtividade enzimática (VINIEGRA-GONZALEZ e FAVELA-TORRES, 2006; GUTARRA et al., 2009; DUARTE, 2012).

Castillho et al. (2000b) fez a comparação econômica entre ambos os sistemas produtivos (FS e FES) e demonstrou que a produção de lipases por *Penicillium restrictum* através de FS necessita de 78% de investimentos a mais que o necessário para a FES. Nesta dissertação, a produção de enzimas será voltada para a posterior utilização no tratamento de efluentes, assim os custos do processo devem ser mínimos e a produtividade deve ser garantida. Desta forma, analisando-se todos estes diversos fatores, optou-se pela utilização da FES como sistema de produção de enzimas. Além disto, a FES permite a utilização direta do preparado enzimático sólido (PES) que, apesar de ser ricamente constituído pela enzima que se almeja produzir, pode possuir diversas outras enzimas que também detém importância perante o tratamento de efluentes como as proteases, celulases, amilases e peroxidases (VALLADÃO et al., 2007).

No caso do presente trabalho, o PES deve conter altos níveis de lipases, devido à sua capacidade de hidrolisar seletivamente triglicerídeos presentes no meio. Assim, as lipases serão apresentadas com maiores detalhes no item a seguir.

2.6. Lipases

2.6.1. Características gerais

Como dito anteriormente, o destaque neste trabalho será para a produção de lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3), pertencentes a uma família de enzimas cuja função natural é catalisar a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em triacilgliceróis de cadeia longa, liberando digliceróis, monogliceróis, glicerol e ácidos graxos. Além disto, em ambientes aquo-restritos, as lipases podem catalisar reações de síntese como esterificação, acidólise, alcoólise, interesterificação e aminólise (PARQUES e MACEDO, 2006; SUN et al., 2009), como pode ser observado na Figura 2.4.

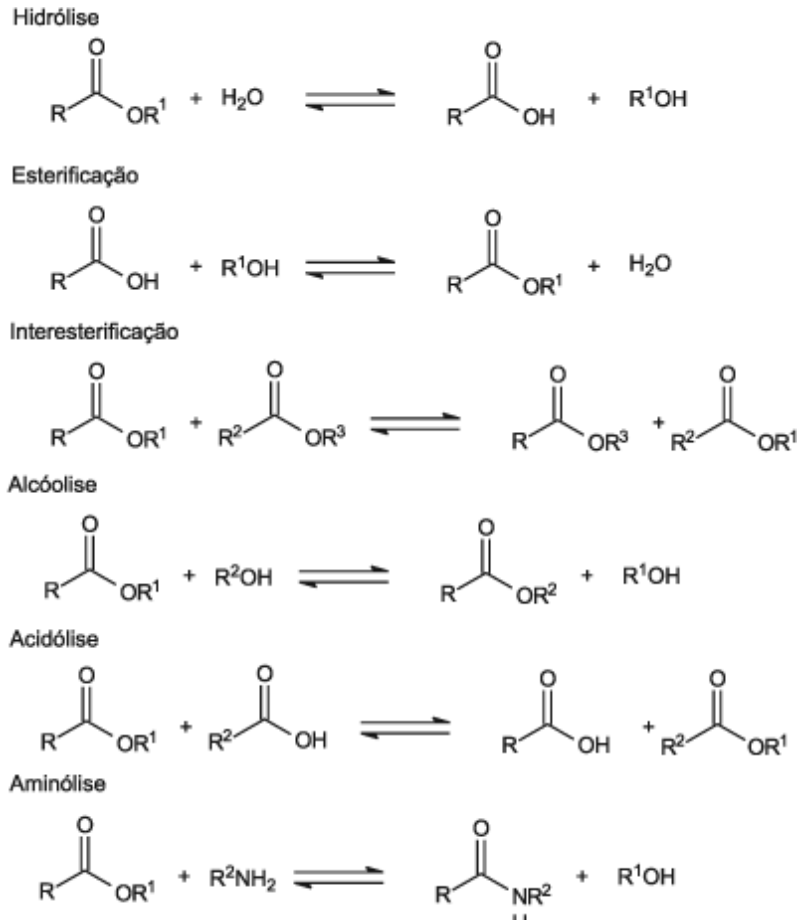

Figura 2.4: Representação das principais reações catalisadas por lipases (GOTOR et al., 2006).

Normalmente, as lipases são encontradas na natureza, sendo produzidas por animais, plantas e micro-organismos. As lipases de origem animal mais conhecidas e estudadas são as obtidas do pâncreas de porcos e de seres humanos (THOMAS et al., 2005). Nestes organismos, são responsáveis por diversas etapas do metabolismo dos lipídios. Nas plantas, as lipases estão presentes nos tecidos de reserva de energia de diversas espécies (SHARMA et al., 2001), sendo também encontradas em vegetais superiores como a mamona – *Ricinus communis* (CAVALCANTI et al., 2007) e pinhão manso – *Jatropha curcas* (SOUSA et al., 2010).

No caso da produção industrial, entretanto, as lipases que possuem maior relevância são aquelas produzidas por micro-organismos, uma vez que estes possuem grande versatilidade, menor tempo de geração e facilidade de manipulação tanto geneticamente, visando aumentar sua capacidade de produção, quanto em relação às suas condições de cultivo (ILLANES, 1994). Além disto, as lipases microbianas são de grande interesse biotecnológico devido às suas características, tais como estabilidade, seletividade e especificidade de substrato (DUTRA et al., 2008; GRIEBELER et al., 2009).

A atuação da maioria das lipases se dá a partir de uma ativação interfacial. Em algumas, esta ativação é explicada pela interação da enzima com a interface lipídio/água, que levaria a uma mudança conformacional da "tampa" (Figura 2.5) – estrutura helicoidal que protege o sítio ativo – expondo, desta forma, o sítio ativo para a catálise (CAJAL et al., 2000).

Além de regular o acesso ao sítio ativo das lipases, estudos mostraram que as lipases que naturalmente não têm uma estrutura como esta "tampa" têm sua atividade enzimática reduzida e sofrem uma alteração na sua especificidade pelo substrato. Estes resultados fortalecem o conceito de que esta "tampa" exerce uma importante função na modulação não somente da atividade, mas também da especificidade, enancioseletividade e estabilidade das lipases (SECUNDO et al., 2007).

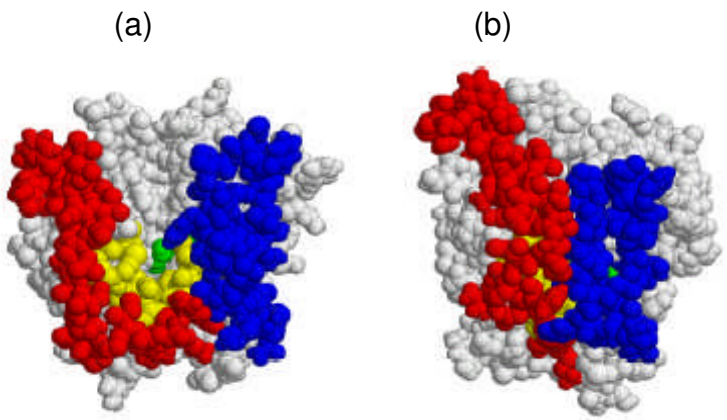

Figura 2.5: Representação tridimensional da lipase de *Pseudomonas aeruginosa.* (a) Conformação aberta da "tampa" que mostra a cavidade com o sítio ativo representado pelas cores amarela e verde. (b) Conformação fechada da "tampa" representada pelas cores vermelha e azul (CHERUKUVADA et al., 2005).

O centro ativo é composto por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina, sendo o primeiro responsável pela catálise. Tal também ocorre em serino-proteases, o que leva a acreditar que o mecanismo catalítico das lipases é semelhante ao das serino-proteases (JAEGER e REETZ, 1998; ALOULOU et al., 2006).

2.6.2. Aplicações de lipases

Quando comparadas aos catalisadores químicos, as lipases possuem uma série de características que favorecem a sua utilização, tais como: maior especificidade, redução do número de etapas de reação a serem realizadas, menor consumo de energia e separação mais fácil de subprodutos (PANDEY et al., 2000). Além disso, as lipases são altamente versáteis, o que permite que sejam utilizadas em diversas aplicações industriais. Estas enzimas podem ser aproveitadas em indústrias nas quais sua aplicação está basicamente relacionada a reações de hidrólise, como as de detergentes e no tratamento de efluentes industriais, assim como pode ser utilizada na indústria alimentícia, farmacêutica, de química fina, de cosméticos e de perfumes, de óleos e

gorduras, de couros, de polpa e papel e na produção de biodiesel, com exploração também das reações de síntese e transesterificação e das características de regio, enancio e quimiosseletividade lipásicas (SHARMA et al., 2001), que permitem sua utilização na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos isômeros.

A principal aplicação comercial envolvendo a capacidade hidrolítica das lipases está na indústria de detergentes, na qual estas enzimas são utilizadas como um aditivo na formulação dos detergentes. Para isto, é importante que a lipase tenha baixa especificidade, para que seja possível hidrolisar gorduras de diversas composições; tenha estabilidade em altas temperaturas e em ambientes alcalinos, como no caso de máquinas de lavar; e seja resistente à ação de outras enzimas e componentes geralmente presentes em detergentes (SHARMA et al., 2001).

As lipases vêm se tornando um componente essencial também na indústria de alimentos, pois permitem a modificação das propriedades dos lipídeos, tanto pelo tamanho de cadeia quanto pelo grau de insaturação dos ácidos graxos ou pela posição dos mesmos no triglicerídeo transformando um lipídeo barato e não desejável em um lipídeo de propriedades adequadas e de alto valor agregado (ZHANG et al., 2006). As lipases também têm sido utilizadas para obtenção de agentes flavorizantes pela síntese de éster com ácido graxo de cadeia curta e alcoóis (MACEDO et al., 2003) e enriquecimento de óleos vegetais (SOUSA et al., 2010). Tais enzimas também atuam nas etapas de fabricação de embutidos, massas, laticínios (SVENSSON et al., 2006; FREIRE e CASTILHO, 2008) assim como de aromas pela hidrólise da gordura do leite (SAXENA et al., 1999).

Na indústria farmacêutica e de química fina são exploradas as características de enâncio e régio seletividade das lipases, pois estas permitem que lipases sejam utilizadas na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos para a síntese de drogas quirais (CUNHA et al., 2007; MANOEL, et al., 2013).

As lipases podem ser utilizadas, por exemplo, para produção de lipídeos estruturados utilizados na alimentação parenteral e enteral, em substituição a óleos vegetais (BJÖRKLING et al., 1991, KHODADADI et al., 2013).

Na indústria de couro, o uso de preparados enzimáticos que contenham lipases, juntamente com outras enzimas como as proteases, pode melhorar o processamento do couro, que envolve a remoção de gordura subcutânea e de pelos em várias etapas (SOUZA e GUTERRES, 2012).

Na indústria de papel e celulose, as lipases são utilizadas para a remoção do *pitch*, um conjunto de componentes hidrofóbicos da madeira, como triacilgliceróis e ceras, que são indesejáveis na manufatura de papel (JAEGER e REETZ, 1998).

Atualmente, uma aplicação de lipases que tem gerado grande interesse é na produção de biodiesel. A produção do biodiesel consiste na transesterificação de óleos ou gorduras com alcoóis de cadeia curta, principalmente metanol e etanol, produzindo alquil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol em uma única etapa. Apesar da via química de produção de biodiesel a partir de óleos vegetais se encontrar industrialmente bem estabelecida, a utilização de uma via enzimática, catalisada especificamente por lipases, se apresenta como uma alternativa interessante para redução dos impactos ambientais (SOUZA et al., 2010; BISEN et al., 2010).

Outra aplicação que vem sendo muito explorada é a utilização de enzimas no tratamento de efluentes como alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais de efluentes. Tal alternativa vem sendo muito estudada pelos Laboratórios de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) e de Tecnologia Ambiental (LTA) da UFRJ (CAMMAROTA e FREIRE, 2006), sendo assim a aplicação de lipases no tratamento de efluentes industriais será melhor descrita a seguir.

2.6.2.1. Aplicações de lipases no tratamento de efluentes

O tratamento de efluentes gordurosos, tais como os oriundos de abatedouros e de indústrias de laticínios e pescado representa também um vasto campo para aplicação de lipases. Diversos trabalhos apontam para o uso de preparados enzimáticos contendo lipases obtidos por fermentação no estado sólido como excelente alternativa para o tratamento de efluentes ricos

em gorduras, oriundos da indústria alimentícia (CAMMAROTA et al., 2001; LEAL et al., 2006; MENDES et al., 2006; VALENTE et al., 2010; VALLADÃO et al., 2011;, ALEXANDRE et al., 2011; DAMASCENO et al., 2012; CAMMAROTA et al., 2013).

O tratamento de efluentes industriais vem sendo cada vez mais estudado nas últimas décadas devido a padrões de descarte mais rigorosos. Assim, trata-se de uma nova e crescente área de atuação de lipases.

Na literatura, foi possível encontrar diversas utilizações de lipases no tratamento de efluentes de diferentes fontes como: lipases de *Candida rugosa* no tratamento de resíduos domésticos e na limpeza de tubulações de esgoto, fossa séptica e sumidouros (JAEGER e REETZ, 1998); a utilização de lipases comerciais de diversas fontes (animal, vegetal e microbiana) no pré-tratamento de efluentes de matadouros (MASSÉ et al., 2001) e de lipases de *Pseudomonas aeruginosa* em efluentes de restaurantes (DHARMSTHITI e KUHASUNTISUK, 1998).

Além disso, há também a aplicação no pré-tratamento enzimático de efluentes ricos em óleos e graxas, oriundos da indústria de laticínios, abatedouros e de pescado. É possível encontrar informações, em diversos artigos, sobre a utilização de lipases de *Penicillium restrictum* produzidas por fermentação no estado sólido em processos híbridos de tratamento enzimático/biológico do tipo anaeróbio e aeróbio (CAMMAROTA et al., 2001; JUNG et al., 2002; LEAL et al., 2006; ROSA et al., 2006, 2009; CAMMAROTA et al., 2013; VALLADÃO et al., 2011; DAMASCENO et al., 2012) Assim como no tratamento de efluentes oriundos de indústrias de pescado através da utilização de PES rico em lipases obtidas pelo fungo *Penicillium simplicissimum* em torta de babaçu (VALENTE et al.; 2010; ALEXANDRE et al., 2011).

Apesar de existirem diversas lipases produzidas em larga escala e aplicadas comercialmente, a plena utilização industrial destas enzimas passa necessariamente pela redução dos custos de produção, principalmente em aplicações que demandam elevadas concentrações de enzimas e nas quais o produto possua baixo valor agregado, como no tratamento de efluentes e na produção de biodiesel (CAMMAROTA e FREIRE, 2006). Desta forma, o emprego da fermentação no estado sólido (FES) como sistema produtivo pode representar uma alternativa interessante para a produção de enzimas

industriais a custos reduzidos (HÖLKER et al., 2004), devido principalmente à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultivo.

2.6.3. Produção de lipases por FES

Historicamente, as lipases microbianas são produzidas através da FS, porém, estudos demonstram o interesse do uso da FES para a produção de enzimas devido à alta produtividade apresentada por este sistema (SUN et al., 2009; GUTARRA et al., 2009). Desta forma, lipases de diferentes micro-organismos têm sido produzidas utilizando-se diferentes rejeitos sólidos, como pode ser observado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Exemplos de resíduos utilizados para a produção de lipase microbiana por FES.

Micro-organismo	**Resíduos utilizados**	**Referência**
Penicillium restrictum	Torta de babaçu	Azeredo et al., 2007
Penicillium simplicissimum	Torta de babaçu	Gutarra et al., 2005
	Torta de soja	Vargas et al., 2008
	Rejeito de mamona	Godoy et al., 2011
	Torta de pinhão manso	Godoy, 2009
Rhizopus homothallicus	Bagaço de cana	Rodriguez et al., 2006
Aspergillus niger	Farelo de trigo	Mahadik et al., 2002
	Torta de gergelim	Kamini et al., 1998

As lipases produzidas nestes diversos trabalhos foram sintetizadas por FES, tendo apresentado, em sua grande maioria, elevada produtividade.

2.6.4. Lipase de *Penicillium simplicissimum*

Em trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa da UFRJ selecionou-se diversas cepas de fungos filamentosos capazes de produzir lipase por FES (GUTARRA et al., 2003), sendo o fungo *Penicillium simplicissimum* capaz de produzir elevadas atividades lipásicas em torta de babaçu (GUTARRA et al., 2005), rejeito de mamona (GODOY et al., 2011), torta de soja (VARGAS et al., 2008) e pinhão manso (GODOY, 2009). Na FES com rejeito de mamona, esta cepa também foi capaz de reduzir o teor de ricina a valores não detectáveis e reduzir o potencial alergênico do rejeito de mamona em aproximadamente 50%, através da hidrólise de albumina 2S (GODOY et al., 2011).

As lipases deste fungo, produzidas por FES em torta de babaçu, apresentaram elevada estabilidade a 55°C em pH 5,5 e atividade ótima a 50°C e pH 4-5 quando comparada com outras lipases de fungos mesofílicos (GUTARRA et al., 2009). As lipases do fungo *P. simplicissimum* produzidas por fermentação em estado sólido têm um grande potencial biotecnológico, não somente devido à sua termoestabilidade, mas também devido ao seu elevado rendimento lipásico a um baixo custo de produção (GUTARRA, 2007). Além disso, as lipases deste fungo produzidas por FES em torta de babaçu apresentaram atividade de esterificação e enâncio-seletividade quando imobilizadas em diferentes suportes (CUNHA et al., 2007). Tais características comprovam o grande potencial para aplicação biotecnológica da enzima produzida.

Como o efluente da indústria de pescado é descartado em elevadas temperaturas e com altos teores de óleos e graxas, seria interessante se aproveitar das calorias provenientes do próprio processamento industrial para realizar uma etapa de pré-tratamento hidrolítico a alta temperatura através da utilização de lipases termoestáveis como é o caso da produzida pelo fungo *P. simplicissimum*. Tal procedimento tem como objetivo reduzir os teores de óleos e graxas para melhorar e viabilizar o posterior tratamento biológico, levando o efluente às condições padrão de descarte discutidos no tópico 2.3.2.

3. Material e métodos

3.1. Efluente sintético empregado nos experimentos de hidrólise e biodegradabilidade

Os ensaios foram realizados com efluente sintético preparado segundo metodologia proposta por Rollón (1999), com modificações. Os efluentes geralmente são compostos por vísceras e partes das cabeças, caudas e ossos dos peixes (BERGE et al., 2007; RAI et al., 2010; DAO e KIM, 2011; EIROA et al., 2012). Além disto, em porções como a cabeça e as vísceras dos peixes está o maior conteúdo de gorduras do efluente. Sendo assim, o efluente foi preparado utilizando-se 160g de cabeças, vísceras, ossos e caudas de sardinha fresca (*Sardinella sp.)* adicionadas a 400 mL de água destilada, sendo esta mistura homogeneizada em liquidificador na menor velocidade pelo tempo de 1 minuto. A mistura foi peneirada em peneira comum de plástico para remoção dos sólidos grosseiros como as escamas, obtendo-se, desta forma, um preparado concentrado. Este preparado era caracterizado em termos de O&G e diluído até obter-se um efluente com concentração de 1500 mg O&G/L para as hidrólises e diluído 10X para realização da caracterização do mesmo. O efluente assim diluído era posteriormente caracterizado quanto a DQO total, DBO_5, O&G, pH, fósforo total, nitrogênio Kjeldahl, sólidos totais (fixos e voláteis).

3.2. Hidrólise enzimática

3.2.1. Micro-organismo produtor de lipase: origem e manutenção

Foi utilizada uma cepa do fungo *Penicillium simplicissimum*, isolada da fermentação natural de rejeitos do processamento da amêndoa de babaçu.

Esta cepa foi selecionada como produtora de lipases por FS através da utilização de diferentes meios semi-sintéticos (FREIRE et al., 1997) e por FES, em meio composto por torta de babaçu (GUTARRA et al., 2003). A manutenção do micro-organismo foi feita em glicerol (20%) e em *freezer* a -20°C ou em nitrogênio líquido.

3.2.2. Preparo do inóculo

A obtenção do inóculo para FES e FS foi realizada através da propagação da cepa a 30°C por 7 dias em meio com a seguinte composição (% m/v): amido solúvel 2,0; $MgSO_4.7H_2O$ 0,025; KH_2PO_4 0,05; $(NH_4)_2SO_4$ 0,5; $CaCO_3$ 0,5; extrato de levedura 0,1; óleo de oliva 1,0; e agar 2,5. Os esporos foram raspados e suspensos em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) estéril, formando a suspensão de esporos. A concentração de esporos foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer.

3.2.3. Fermentações submersas: meios de cultivo e condições

Foram utilizados dois meios de cultivo para a FS:

1. Meio sintético com a seguinte composição (m/v): 1% peptona de carne; 0,5% extrato de levedura; 0,05% sulfato de magnésio; 0,05% cloreto de potássio; 0,001% sulfato de ferro heptahidratado; 1% glicose; 0,3% óleo de oliva, diluídos em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,6. Relação C:N de 8,9:1. Este meio foi denominado de FS.

2. 2,5% (m/v) de torta de babaçu com tamanho de partícula < 1,18 mm, suspensa em água destilada. Este meio foi denominado de FSB.

As fermentações submersas (FS) foram conduzidas em *erlenmeyers* de 1L contendo 240 mL de meio líquido inoculado com $2x10^4$ esporos/mL e incubado em agitador rotatório a 30°C e 170 rpm (FREIRE, 1996).

O preparado enzimático líquido (PEL) foi preparado através de filtração a vácuo do meio líquido fermentado. Uma alíquota do extrato obtido foi utilizada para a determinação da atividade lipásica, sendo o restante utilizado imediatamente após a sua extração nos experimentos de hidrólise.

3.2.4. Fermentações no estado sólido

A matéria-prima empregada como meio de fermentação foi a torta de babaçu obtida a partir do rejeito da produção de óleo de babaçu, fornecida pela empresa Tocantins Babaçu S.A (TOBASA) e o melaço de cana utilizado, um rejeito da produção de açúcar cristalizado.

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi necessária a utilização de duas tortas - torta 1 e torta 2. Devido a falta de energia elétrica por longos e sucessivos períodos de tempo, houve a contaminação da torta 1, que foi utilizada somente no período de Outubro até Dezembro de 2011. A torta 2, por sua vez, foi utilizada de Fevereiro de 2012 até a conclusão dos experimentos em Fevereiro de 2013.

Tanto a torta 1 quanto a torta 2 foram trituradas em moinho de faca, obtendo-se partículas com diâmetros de até 3 mm, sendo utilizada a faixa < 1,18mm para a produção do preparado enzimático sólido (PES).

Para as fermentações, os reatores foram inoculados com 10^7 esporos/g de massa seca de torta de babaçu e incubados em uma câmara com temperatura e umidade controladas a 30°C e 90%, respectivamente.

Para a torta 1, os sólidos foram suplementados com 6,25% (m/m) de melaço e umedecidos, inicialmente, a 65% (m/m) para a realização das fermentações. Esta condição já havia sido pré estabelecida em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Silva, 2011), utilizando o mesmo lote de resíduo agroindustrial. As fermentações foram conduzidas em reatores do tipo bandeja

cilíndricos com 15cm de altura e 10 de diâmetro, contendo 15g de torta perfazendo um leito de aproximadamente 1 cm de altura.

Para a torta 2 foi feito um estudo a 70% e 65% (m/m) com 6,25% (m/m) de melaço e foram utilizados os mesmos reatores do tipo bandeja cilíndricos utilizados para a torta 1, porém, com 15 e 10g de torta de babaçu, durante 24h, 48h, 72h e 96h a fim de verificar a umidade, quantidade de torta e tempo ótimos para conduzir a fermentação visando melhores produções de atividade lipásica. Após a verificação, a fermentação passou a ser conduzida com 15g de torta e 70% de umidade inicial durante 72h de fermentação.

O extrato bruto enzimático foi preparado utilizando-se uma condição padrão de 5 mL/g de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) sob agitação constante de 200 rpm, a 35°C por 20 minutos. Em seguida, a torta foi prensada para se obter o extrato enzimático bruto, que foi centrifugado a 3000g por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade lipásica. O restante da torta fermentada foi armazenado a vácuo em congelador e utilizado, posteriormente, nos experimentos de hidrólise.

3.2.5. Condução dos experimentos de hidrólise

Neste trabalho, foram avaliadas, de acordo com o tempo, cinco valores de atividade do PES (m/v), juntamente com o Controle (0 U/mL de efluente ou sem adição de PES), a saber: 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,67 U/mL de efluente. Estes experimentos de hidrólise foram conduzidos para se determinar o melhor tempo e atividade enzimática para o tratamento do efluente.

Após a determinação da melhor condição de hidrólise com PES, esta também foi aplicada utilizando-se o PEL (v/v). Estes experimentos foram conduzidos para se avaliar o efeito de um nível mais elevado de protease sobre o lodo na etapa de tratamento biológico anaeróbio.

A diluição do preparado concentrado para obtenção dos efluentes utilizados nas hidrólises foi calculada de modo a obter-se uma concentração inicial de 1500 mg O&G /L, que é a maior concentração de óleos e graxas já obtida em efluentes da indústria de pescado (VALENTE et al., 2010).

A hidrólise foi realizada em *erlenmeyers* de 500mL contendo 250mL de efluente, agitados em *shaker* a 150 rpm e 50°C. Foram retiradas alíquotas de 10 mL de 4 em 4 horas até 24 horas, a fim de se avaliar a cinética de produção de ácidos livres.

Posteriormente, a hidrólise também foi realizada na condição empregada por Valente et al. (2010): a 30°C, por 8h, com uma concentração de 0,5% de PES (m/v). Tal procedimento teve como objetivo comparar o tratamento feito por Valente et al. (2010), com efluente proveniente da indústria de pescado, com o tratamento com efluente sintético quanto à redução de DQO e à produção de metano.

3.2.6. Cálculo da quantidade de PES/PEL para cada hidrólise

O PES/PEL, obtido através de FES/FS do fungo *P. simplicissimum,* foi utilizado diretamente no processo de hidrólise do efluente. O cálculo da quantidade de PES ou PEL que seria utilizado para cada hidrólise foi feito da seguinte maneira:

$$Q_{pe} = \frac{U \cdot V_f}{A} \qquad \textit{(Equação 3.1)}$$

Onde:

Q_{pe} = Quantidade de preparado enzimático (mL: PEL e g:PES)

U = Atividade enzimática almejada para conduzir a hidrólise (U para cada 1 mL de efluente)

V_f = Volume final da hidrólise (mL)

A = Atividade lipásica quantificada no PES/ PEL (U/g de massa seca ou U/mL)

3.2.7. Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia

Após a hidrólise, os efluentes pré-tratados enzimaticamente e o efluente bruto (sem adição do PES ou PEL) foram empregados nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia. Os ensaios foram conduzidos em frascos tipo penicilina de 100 mL com 90% do volume útil composto de lodo anaeróbio e efluente bruto ou pré-tratado.

O lodo foi coletado em reator UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) mesofílico em operação em indústria de abate de aves, sendo a quantidade de lodo utilizada em cada ensaio de biodegradabilidade calculada para se manter uma relação DQO (inicial do efluente): SSV (lodo) de 1:1. Os frascos foram selados com tampas de borracha e lacres de alumínio e incubados a 30 ou 50°C até que a medição do volume acumulado de biogás se tornasse estável.

A biodegradabilidade foi avaliada através da medida de eficiência de remoção de DQO e produção de biogás, realizada por deslocamento do êmbolo de seringas plásticas graduadas de 20 mL conectadas aos frascos. Alíquotas para determinação da DQO (denominadas DQO inicial) foram tomadas após a hidrólise, sem a mistura com o lodo anaeróbio. A DQO final foi determinada no último dia do ensaio de biodegradabilidade. Para fazer a análise da DQO final, primeiramente era feito o recolhimento do biogás para análise por cromatografia em fase gasosa e posteriormente era feita a abertura dos frascos tipo penicilina. Os experimentos foram conduzidos sempre em quintuplicata.

Após a seleção da melhor condição de ensaio, foram realizadas cinéticas nas quais foram avaliados pH, produção específica de metano e remoção de DQO, ao longo do tempo, para comparar três condições distintas que foram intituladas conforme descrito abaixo:

1) Mesofílica: Hidrólise com 0,5% de PES, 8h a 30°C, ensaios de biodegradabilidade anaeróbia a 30°C (Valente et al., 2010);
2) Termofílica: a condição definida neste trabalho - Hidrólise com 0,16U/mL de efluente a 50°C e ensaio de biodegradabilidade anaeróbia a 50°C;

3) Híbrida: nova condição proposta por este trabalho: Hidrólise com 0,16U/mL de efluente a 50°C e ensaio de biodegradabilidade anaeróbia a 30°C.

Nestes experimentos de avaliação da remoção de DQO e produção de metano ao longo do tempo, foram empregados 50 frascos. A cada 4, 12, 24 ou 48 horas, dependendo da avaliação da produção de gás, após a medição do volume de biogás, 5 frascos eram sacrificados para a extração do volume de biogás produzido e determinação do percentual de metano e da DQO. Este procedimento foi repetido até 228 horas, quando a remoção de DQO e a produção de metano foram estabilizadas.

3.2.7.1. Adaptação do lodo

O lodo foi adaptado ao efluente sintético que simulava o efluente de indústria de processamento de pescado e à temperatura de 50ºC. Para tal, cerca de 1/3 do volume útil de garrafões de 1L eram preenchidos com lodo e o restante com efluente sintético com baixo teor de gordura inicialmente diluído para uma DQO de 300mg/L. Os garrafões eram tampados com rolhas de borracha com uma única saída para coleta e medição do biogás produzido por deslocamento líquido e incubados em estufa a 50ºC. Quando a produção de biogás estabilizava, o que se dava em torno de 7 dias, inicialmente, o meio sobrenadante era substituído por efluente diluído fresco. Conforme o lodo se tornava adaptado ao efluente, a produção de biogás se estabilizava rapidamente (3 dias). O meio sobrenadante era igualmente substituído, porém por um meio com DQO mais elevada, gradativamente, até atingir o máximo de 2000mg/L.

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Teor de umidade na FES

Amostras de 1g de material fermentado úmido foram colocadas em uma balança analisadora de umidade (AND MX-SO) até atingir massa constante. O teor de umidade da amostra foi calculado de acordo com a Equação 3.2.

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \frac{(\text{massa úmida} - \text{massa seca}) \cdot 100}{\text{massa úmida}} \qquad \textit{(Equação 3.2)}$$

3.3.2. Determinação da atividade lipásica

A atividade lipásica foi medida pelo método espectrofotométrico, que se baseia na formação de um produto cromóforo (*p*-nitrofenol) a partir da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato catalisada por lipases.

Para as amostras de FS com e sem torta de babaçu e FES a solução do substrato foi preparada utilizando-se 0,25 mL de *p*-nitrofenil laurato 2,5 mM em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato enzimático e conduzida a 30ºC e 50ºC. A formação do *p*-nitrofenol foi acompanhada em espectrofotômetro UV 1800 SHIMADZU a 412 nm. Uma unidade de atividade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 µmol de *p*-nitrofenil laurato por minuto nas condições de ensaio. A atividade lipásica foi expressa em U/mL e convertida à unidade de U/g tratando-se da FES.

Os cálculos da atividade lipásica foram feitos utilizando a Equação 3.3.

$$A_L = \frac{(\alpha \cdot F \cdot V_f)}{V} \cdot F_d \qquad \textit{(Equação 3.3)}$$

Onde:

A_L = atividade (U/mL)

α = coeficiente angular da reta (Abs x tempo)

F = fator (Abs x concentração de produto)

V_f = volume final (mL)

V = volume de amostra (mL)

F_d = fator de diluição

3.4.3. Determinação da atividade Proteásica

A atividade proteásica foi medida pelo método descrito por (BENDICHO et al. 2002), no qual a tubos Eppendorf foram adicionados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de solução de azocaseína (0,5% m/v) diluída em 5% de NaOH 0,02M e 15% de água destilada, sendo o pH ajustado com HCl 1M até 5 e posteriormente avolumado com tampão acetato pH 5. Esta mistura foi incubada por 5 minutos em banho a 37ºC e 50°C. Após este período, a reação foi parada com a adição de 1mL de HCl 1M. O branco da reação foi feito da mesma forma, porém, antes da reação se iniciar, já foi adicionado 1 mL de HCl. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm, por 5 minutos e posteriormente as amostras foram lidas a 345nm em espectrofotômetro SP-22. O cálculo da atividade (em U/g) foi feito segundo a Equação 3.4.

$$A_P = \frac{(F_d \,.\, Abs)}{(T_R \,.\, V_A \,.\, MS)} \,.\, V \qquad \textit{(Equação 3.4)}$$

Onde:

A_P = Atividade proteásica (U/g)

F_d = Fator de diluição

Abs = Absorbância da amostra a 345 nm

T_R = Tempo da reação (minutos)

V_A = Volume de amostra (mL)

MS = Massa seca de torta utilizada na fermentação (g)

V = Volume utilizado para a extração da enzima (mL).

3.3.3. Ácidos Livres

O monitoramento da produção de ácidos livres na hidrólise foi realizado pela titulação dos ácidos livres liberados. Após a coleta da alíquota (10 mL), a reação de hidrólise foi paralisada com 10 mL de solução de acetona:etanol

(1:1) e o teor de ácidos liberados foi determinado em titulador automático Mettler Toledo G20 até pH 11,0 com solução de NaOH 0,04 mol/L. Os brancos reacionais foram obtidos através do monitoramento, sob as mesmas condições de reação, porém sem a adição de PES ou PEL.

O teor de ácidos livres foi calculado pela Equação 3.5:

$$A_L = \frac{V \cdot N \cdot 1000}{V_{am}} \qquad \textit{(Equação 3.5)}$$

Sendo:

A_L = teor de ácidos livres (µmol/mL)

V = volume de NaOH titulado (mL)

N = normalidade da solução de NaOH

V_{am} = volume de amostra (mL)

3.3.4. pH

O pH das amostras de efluente antes e após tratamento anaeróbio foi medido por leitura direta em potenciômetro do pHmetro Mettler Toledo, modelo 320, após calibração com padrões pH 4,0 e 7,0.

3.3.5. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO foi medida pelo método padrão colorimétrico de refluxo fechado, com $K_2Cr_2O_7$ em meio ácido, contendo Ag_2SO_4 como catalisador e $HgSO_4$ para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra. Para a DQO solúvel as amostras foram filtradas em membranas de 0,45µm e então diluídas se necessário. No caso da DQO total, o efluente não passava pela etapa de filtração. Posteriormente, às amostras foram adicionados os reagentes

(soluções catalítica e digestora) e estas foram digeridas a 150ºC, durante 2 horas. Após resfriamento, a absorbância a 600 nm foi lida em espectrofotômetro Hach DR 2000. As análises foram realizadas em triplicata e o branco reacional foi preparado pela adição de água em substituição à amostra. Uma curva padrão foi preparada previamente empregando-se biftalato de potássio como substância padrão, sendo utilizada para converter a absorbância (600nm) das amostras em DQO (APHA, 2005).

A eficiência de remoção de DQO nos testes de biodegradabilidade anaeróbia foi calculada de acordo com a Equação 3.6:

$$\% \text{ DQO remov} = \frac{DQO_i - DQO_f}{DQO_i} \cdot 100 \qquad \textit{(Equação 3.6)}$$

Sendo:

% DQO remov = porcentagem de DQO removida

DQO_i = DQO inicial do efluente a ser tratado

DQO_f = DQO do efluente após o tratamento

3.3.6. Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

Foi empregado o método da diluição padrão (APHA, 2005). A um balão volumétrico de 1000 mL foram adicionados 500mL de água destilada e 1mL das seguintes soluções: sulfato de magnésio 1 M, cloreto de cálcio 1M, cloreto férrico 1M, e tampão fosfato pH 7,0. A mistura formada, denominada água de diluição, foi agitada vigorosamente para saturá-la de oxigênio dissolvido (O.D.) e, posteriormente, avolumada para 1 L. As amostras do efluente foram diluídas convenientemente nesta água de diluição e transferidas cuidadosamente para 3 frascos de DBO de modo a se evitar a entrada de ar. A leitura da concentração inicial de O.D. era feita através de oxímetro digimed (15 minutos após o preenchimento de todo o volume dos frascos com a amostra diluída) e os frascos incubados durante 5 dias a 20ºC no escuro. Após este período, a

concentração de O.D. era novamente determinada. A determinação do O.D. foi realizada por meio de eletrodo de membrana e as diluições que apresentaram uma concentração residual de O.D. de pelo menos 1mg/L e um esgotamento (consumo de O.D. no período de 5 dias) de pelo menos 2mg/L foram consideradas as mais confiáveis. A DBO foi então calculada pela Equação 3.7:

$$DBO = \frac{(O..D._{ia} - O.D._{fa})}{D} \qquad \textit{(Equação 3.7)}$$

Sendo:

DBO = demanda bioquímica de oxigênio (mgO_2/L)

$O.D_{ia}$ = O.D. da amostra diluída 15 minutos após seu preparo

$O.D_{fa}$ = O.D. da amostra diluída após a incubação

D = fração decimal de amostra usada

3.3.7. Óleos e Graxas no Efluente (O & G)

O teor de óleos e graxas em amostras do efluente foi determinado por extração em Soxhlet utilizando hexano como solvente, de acordo com metodologia padrão (APHA, 2005). Um determinado volume da amostra foi acidificado com HCl 1:1 (v/v) e filtrado à vácuo em um disco de tecido sobre o qual foi colocado um disco de papel Whatman nº 4 e uma camada de diatomita, obtida pela filtração de uma suspensão de terra diatomácea em água a 5% (m/v). Os resíduos não filtráveis, contendo as gorduras retidas, foram introduzidos em cartucho de extração previamente descontaminado com hexano e todo o conjunto foi seco em estufa a 105ºC, por 30 minutos. Após o resfriamento, foi iniciada a extração com hexano a uma velocidade de 20 ciclos por hora, durante 4 horas. Após esse período, o solvente foi evaporado em rotoevaporador e o balão de destilação contendo as gorduras extraídas foi seco em estufa a 70ºC e pesado após resfriamento em dessecador. A concentração de óleos e graxas presentes na amostra foi calculada de acordo com a Equação 3.8:

$$O\&G = \frac{(P_2 - P_1) \ . \ 1000}{V} \qquad \textit{(Equação 3.8)}$$

Sendo:

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

P_2 = peso do balão + resíduo (mg)

P_1 = peso do balão vazio (mg)

V= volume da amostra (mL)

3.3.8. Fósforo Total (PT)

A determinação da concentração de fósforo foi realizada pela digestão da amostra em balão Kjeldahl contendo 1mL de H_2SO_4 concentrado e 5mL de HNO_3 concentrado, sob aquecimento, até a completa liberação de fumos brancos. Após o resfriamento, foram adicionados 20mL de água destilada, 0,05mL de indicador fenolftaleína e quantidade suficiente de solução de NaOH 1 mol/L para a formação de cor. A amostra foi avolumada a 100mL e, posteriormente, 35mL desta solução foram adicionados a balão volumétrico de 50mL juntamente com 10mL do reagente vanadatomolibdato. Após completar o volume e aguardar 10 minutos, a leitura da absorbância a 490 nm foi realizada em espectrofotômetro Hach DR 2000. O branco reacional foi preparado pela adição de água no lugar da amostra e uma curva-padrão foi elaborada com uma solução padrão de KH_2PO_4 (APHA, 2005). A concentração de fósforo nas amostras foi calculada conforme a Equação 3.9.

$$PT = \frac{Absa \ . \ 100 \ . \ 50}{\alpha \ . \ Va \ . \ 35} \qquad (\textit{Equação 3.9})$$

Sendo:

PT = fósforo total (mg/L)

Absa = absorbância da amostra

α = coeficiente angular da curva padrão

Va = volume de amostra (mL)

3.3.9. Nitrogênio Kjeldahl total (NKT)

O teor de Nitrogênio Kjeldahl Total foi determinado pelo método padrão, com algumas modificações (APHA, 2005). Uma amostra de efluente foi digerida em 10mL de ácido sulfúrico concentrado na presença de 2g de uma mistura catalisadora formada de K_2SO_4 e $CuSO_4$ (1:1 m/m). Após a digestão, a solução foi neutralizada com 30mL de NaOH (60%, m/v) e a amônia formada foi destilada e absorvida em 25mL de solução de ácido bórico (2%, m/v), sendo em seguida titulada com HCl 0,04 mol/L, empregando-se vermelho de metila/verde de bromocresol como indicador. O branco da reação foi realizado pela adição de água isenta de amônia em substituição à amostra. A concentração de nitrogênio foi calculada pela Equação 3.10.

$$NKT = \frac{(V_a - V_b) \cdot f \cdot 560}{V_{am}} \qquad (\textit{Equação 3.10})$$

Sendo:

NKT = concentração de nitrogênio Kjeldahl na amostra (mg/L)

f = fator de padronização do HCl

V_a = volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL)

V_b = volume de HCl gasto na titulação do branco (mL)

Vam = volume de amostra empregado (mL)

560 = fator de conversão de HCl para N (na concentração em NKT - normalidade do HCl x massa molecular do N x 1000)

3.3.10. Sólidos Totais, Fixos e Voláteis (ST, SFT e SVT)

A determinação dos sólidos totais, fixos e voláteis, foi feita em cápsulas de porcelana previamente taradas em mufla a 550ºC durante 30 minutos (P1). Um volume de amostra de 20mL de efluente foi adicionado à cápsula e aquecido em estufa a 105ºC até peso constante (P2). A cápsula foi, então, novamente levada à mufla a 550ºC por 30 minutos (P3). As concentrações de sólidos totais (ST), fixos (SFT) e voláteis (SVT) foram calculadas através das Equações 3.11 a 3.13.

$$ST = \frac{(P_2 - P_1) \cdot 10^6}{V} \qquad \textit{(Equação 3.11)}$$

$$SFT = \frac{(P_3 - P_1) \cdot 10^6}{V} \qquad \textit{(Equação 3.12)}$$

$$SVT = \frac{(P_2 - P_3) \cdot 10^6}{V} \qquad \textit{(Equação 3.13)}$$

Sendo:

ST = sólidos totais (mg/L)

SFT = sólidos fixos totais (mg/L)

SVT = sólidos voláteis totais (mg/L)

P_1 = peso da cápsula vazia (g)

P_2 = peso da cápsula + resíduo após estufa a 105ºC (g)

P_3 = peso cápsula + resíduo após mufla (g)

V = volume da amostra (mL)

3.3.11. Medição e Análise da Composição de Biogás

O volume do biogás produzido nos testes conduzidos em frascos tipo penicilina de 100 mL, com 10 % de "*headspace*", ou seja, com o preenchimento de 90 mL pela mistura de efluente pré-tratado ou não e lodo anaeróbio foi medido pelo deslocamento do êmbolo de seringas de 20 mL, conectadas aos frascos. O biogás produzido foi recolhido em ampolas gasométricas e injetado diretamente no cromatógrafo VARIAN MICRO GC 4900 para determinação do percentual de metano. As condições utilizadas na cromatografia foram:

Coluna- PPQ – 10 m x 0,32 mm

Temperatura da coluna - 50°C

Detector – condutividade térmica (TCD)

Temperatura do detector - 250°C

Temperatura do injetor - 80°C

Gás de arraste – Hélio

Tempo de análise – 1,5 minutos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização do efluente

Um efluente sintético, formulado com base no trabalho de Rollòn (1999) e conforme metodologia descrita no item 3.1, foi utilizado nos experimentos do presente estudo. O efluente foi caracterizado quanto a DQO total, DBO_5, O&G, pH, fósforo total, nitrogênio Kjeldahl e sólidos totais (fixos e voláteis). Na Tabela 4.1 são apresentadas as características do efluente sintético juntamente com as de efluentes provenientes da indústria de pescado.

Tabela 4.1: Caracterização do efluente sintético em comparação a efluente industrial.

	Efluente sintético	**Efluente industrial (VALENTE, 2009)**
pH	6,5 – 6,9	5,5 – 7,2
DQO (mg/L)	6000 – 15767	1313 – 12025
DBO (mg/L)	2122	967 – 2900
NKT (mg/L)	123,3	5,3 – 499
PT (mg P/L)	56,8	51 – 1400
O&G (mg/L)	2111 - 6317	78 – 3656
ST (mg/L)	2271	848 – 1485
SFT (mg/L)	208	140 – 230
SVT (mg/L)	2063	618 – 1345

DQO – demanda química de oxigênio; DBO – demanda bioquímica de oxigênio; NKT – nitrogênio Kjeldahl total; PT – fósforo total; O&G – óleos e graxas; ST – sólidos totais; SFT – sólidos fixos totais; SVT – sólidos voláteis totais.

Conforme pode ser observado na Tabela 4.1, à exceção dos maiores valores de sólidos voláteis totais (SVT) e, portanto, de sólidos totais (ST) e dos resultados elevados de óleos e graxas, os valores obtidos para o efluente

sintético estão dentro das faixas obtidas na caracterização do efluente industrial e são similares aos obtidos para efluentes encontrados na literatura e descritos na Tabela 2.2. A maior concentração de SVT é devido à inclusão de praticamente todo o material suspenso obtido na composição do efluente sintético, pois o peneiramento removia apenas sólidos grosseiros, enquanto nos efluentes industriais este tipo de material é separado durante o processamento do pescado.

Devido à presença de sangue, proveniente principalmente das cabeças dos peixes (VALLE e AGUILEIRA, 1990), o efluente sintético apresentou cor avermelhada e DQO muito elevada.

4.2. Hidrólise enzimática

4.2.1. Produção de enzimas em fermentação no estado sólido utilizando a torta 1

Normalmente, os trabalhos envolvendo a aplicação de preparados enzimáticos sólidos (PES) em efluentes ricos em óleos e gorduras são feitos por porcentagem de PES (massa de PES para cada 100mL de efluente) (LEAL et al., 2006; MENDES et al., 2006; VALLADÃO et al., 2007; VALENTE et al., 2010; ALEXANDRE et al., 2011). No entanto, nestes trabalhos a influência do PES na hidrólise era avaliada em termos de concentração de PES e não de atividade enzimática. Entretanto, Valladão (2009) notou que houve diferenças nas concentrações de ácidos graxos livres produzidos nas hidrólises devido à utilização de PES com diferentes atividades enzimáticas, o que indica que a utilização da atividade enzimática ao invés da concentração de PES pode ser um fator para maior reprodutibilidade do processo.

Sendo assim, no intuito de comparar o presente trabalho ao de Valente et al. (2010) e de diminuir a atividade lipásica empregada pela autora nas hidrólises de efluente proveniente de indústrias de processamento de pescado, optou-se por empregar o valor de atividade lipásica por mL de efluente utilizada

nas hidrólises, uma vez que o PES utilizado pela autora possuía atividade lipásica aproximadamente 3 vezes maior que o PES utilizado neste trabalho (134 ± 7 U/g a 30°C) como poderá ser visto a seguir.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foram realizadas seis fermentações no estado sólido, sendo as duas primeiras realizadas com a torta 1, cuja atividade lipásica média a 30°C foi de 38,05 ± 18,90 U/g e a 50°C foi de 51,64 ± 20,62 U/g.

Após a formulação e caracterização do efluente sintético e definição da atividade lipásica do *pool* enzimático obtido a partir da torta 1, foram iniciados os testes de hidrólise cujos resultados são apresentados no item 4.3.1.

4.2.2. Produção de enzimas em fermentação no estado sólido utilizando a torta 2

As quatro demais fermentações foram realizadas com a torta 2, seguindo as condições explicadas no tópico 3.2.4. A fim de analisar que tempo de fermentação deveria ser utilizado para obtenção de maiores atividades lipásicas, foi feito um estudo da produção de atividades lipásica e proteásica utilizando-se a torta 2 em 24h, 48h, 72h e 96h nas condições já estabelecidas anteriormente por Silva (2011): 15g de torta com 6,25%(m/m) de melaço e 65% de umidade inicial, conforme apresentado na Figura 4.1.

Silva (2011), utilizando o mesmo lote da torta 1 do resíduo agroindustrial e o fungo *P. simplicissimum* nas mesmas condições de FES, obteve atividade lipásica de aproximadamente 80 U/g a 30°C, no tempo de 48h de fermentação. Entretanto, utilizando-se a torta 2, percebe-se na Figura 4.1 que a atividade lipásica em 48h foi de 9,6U/g. Apesar deste valor representar o pico da atividade lipásica, pois se observa um decréscimo da mesma *a posteriori*, está abaixo do valor conseguido anteriormente com a torta 1 (SILVA, 2011). É possível notar, também, uma elevada atividade proteásica, que em 48h é 2,7 vezes maior que a atividade lipásica.

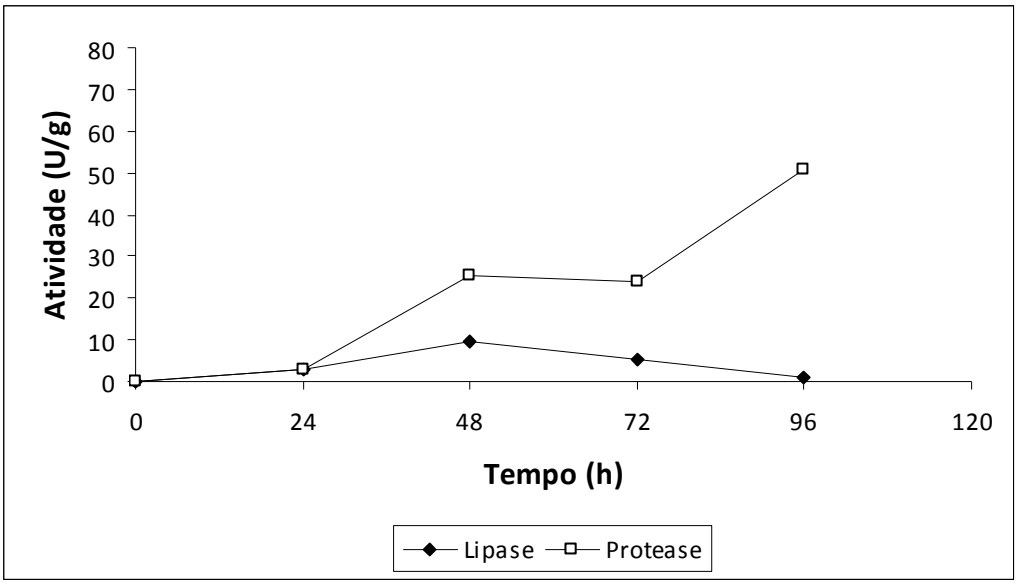

Figura 4.1: Variação das atividades proteásica e lipásica (a 50°C) durante FES com 15g de torta, 6,25%(m/m) de melaço e 65% de umidade inicial.

As proteases vêm sendo descritas na literatura como causadoras do decréscimo da atividade de diversos tipos de enzima quando se encontram em excesso no meio fermentativo. Por exemplo, Aguilar et al. (2001a) associou o aumento da produção da enzima tanase em FES à menor atuação de proteases, uma vez que em FS a produção de proteases foi 8 vezes maior e o aumento de produção das tanases só foi conseguido mediante o uso de inibidores de protease. A maior produtividade de pectinases em FES também foi associada, entre outros fatores, à menor degradação promovida pelas proteases (DIAZ-GODÍNEZ et al., 2001). Assim como Gutarra (2007), que associou o fato da enzima ter mantido sua atividade estável após o pico de produção à menor atuação de proteases. Um excesso de proteases no PES poderia ser prejudicial à atuação das lipases na degradação das gorduras do efluente, uma vez que possivelmente promoveria a degradação das lipases. Desta forma, foi feita uma variação entre os valores iniciais de umidade e de torta na fermentação, a fim de diminuir a produção de proteases ou, ao menos, chegar a valores próximos aos das lipases.

Assim, foram feitas mais três fermentações baseadas na mistura de condições utilizadas por Gutarra (2007) que, ao realizar fermentações com o mesmo fungo e resíduo agroindustrial, utilizou 10g de torta enriquecida com

6,25%(m/m) de melaço e 70% de umidade inicial e obteve 58,9 U/g de atividade lipásica em 72h de fermentação. Desta forma, as condições (1, 2, 3 e 4) utilizadas foram:

1) 65% de umidade inicial, 15g de torta, 6,25%(m/m) de melaço (Figura 4.1)
2) 65% de umidade inicial, 10g de torta, 6,25%(m/m) de melaço (Figura 4.2)
3) 70% de umidade inicial, 15g de torta, 6,25%(m/m) de melaço (Figura 4.3)
4) 70% de umidade inicial, 10g de torta, 6,25%(m/m) de melaço (Figura 4.4)

Nas Figuras a seguir são apresentadas as cinéticas de atividades lipásica e proteásica ao longo do tempo (24h, 48h, 72h e 96h) nas condições 2, 3 e 4.

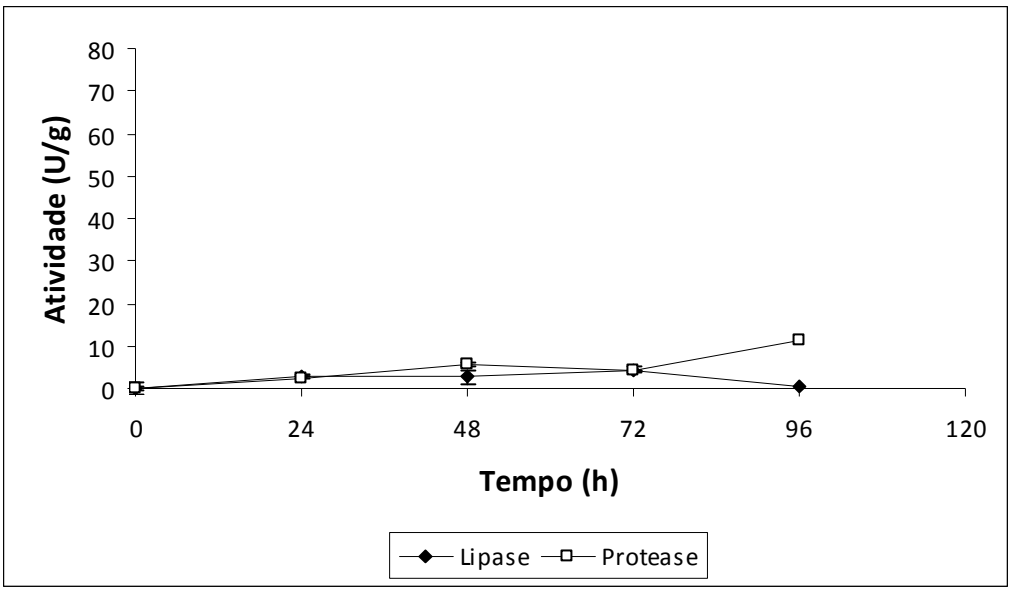

Figura 4.2: Atividades proteásica e lipásica (a 50°C) na condição 2 - 10g de torta, 6,25%(m/m) de melaço e 65% de umidade inicial.

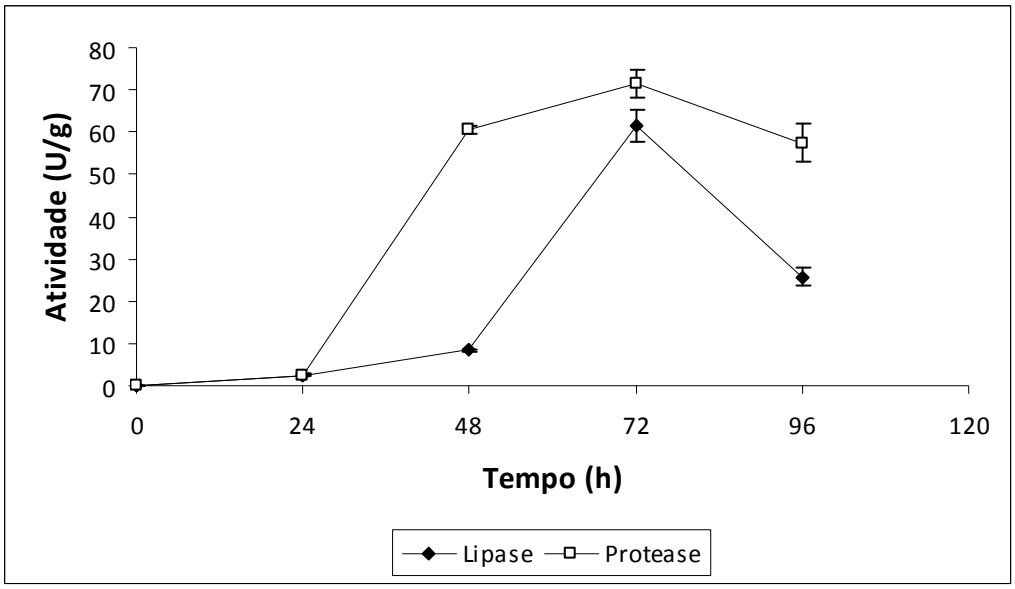

Figura 4.3: Atividades proteásica e lipásica (a 50°C) na condição 3 - 15g de torta, 6,25%(m/m) de melaço e 70% de umidade inicial.

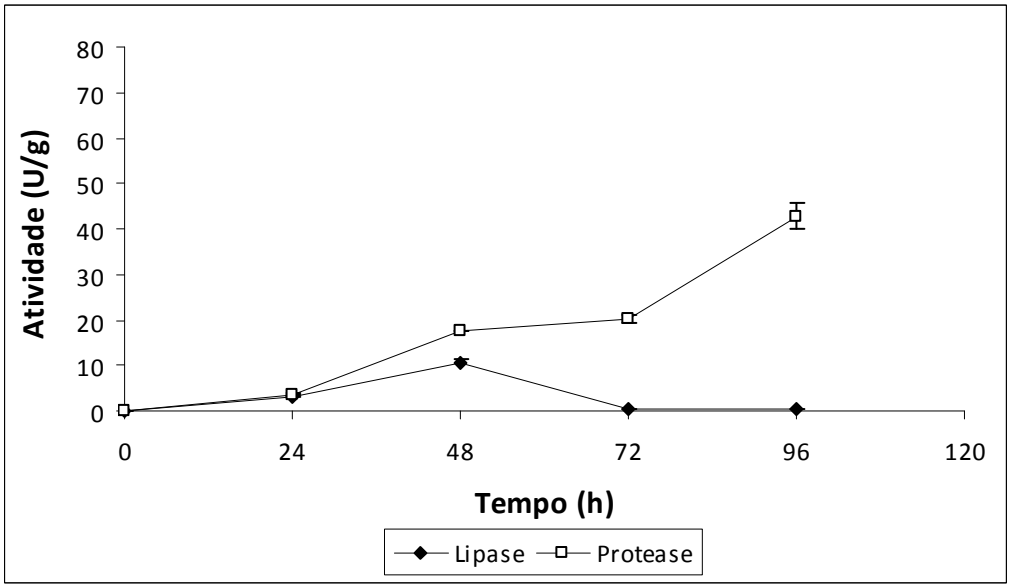

Figura 4.4: Atividades proteásica e lipásica (50°C) na condição 4 - 10g de torta, 6,25%(m/m) de melaço e 70% de umidade inicial.

Observando-se o perfil cinético de todas as condições (1 a 4) foi possível notar a produção constante de lipases e proteases. Assim, a condição escolhida para as fermentações seria aquela de menor razão entre as atividades proteásica e lipásica, uma vez que a atividade proteásica se mostrou maior em todas as cinéticas realizadas. Uma ordem decrescente da razão de

atividades proteasíca:lipásica foi obervada da condição 1 (2,7:1 em 48 h) para as condições 4 (1,7:1 em 48h), 3 (1,16:1 em 72 h) e 2 (1,05:1 em 72 h). Na condição 2, as atividades proteásica e lipásica encontradas foram 4,2 e 4,4 U/g, respectivamente, em 72h, o que representa um valor baixo quando comparadas às demais. A condição 3, apesar de apresentar uma razão ligeiramente maior (1,16:1) que na condição 2 (1,05:1), apresentou atividade lipásica de 61,4 U/g em 72 h. Assim, a condição 3 foi escolhida para os experimentos de hidrólise.

Empregando-se a condição 3 na condução das FES com a torta 2, a média das atividades lipásicas obtidas foram de 46,05 ± 17,8 U/g a 30°C e de 74,6 ± 28,83 U/g a 50°C (condição em que será conduzida a hidrólise).

Após definição da condição responsável pela melhor relação entre atividade lipásica e proteásica do *pool* enzimático obtido a partir da torta 2, foram iniciados os testes de hidrólise apresentados no item 4.3.2.

4.2.3. Produção de enzimas em fermentação submersa

Embora a produção de enzimas por fermentação submersa utilizando meios sintéticos apresente custo mais elevado que a utilização de resíduos da agroindústria na fermentação no estado sólido (CASTILHO et al., 2000a), fermentações submersas foram realizadas no intuito de testar se a torta de babaçu seria a responsável por induzir uma maior produção de proteases ou se a produção de proteases era parte constitutiva do fungo *P.simplicissimum*, conforme pode ser observado no item 4.5.1.

Freire et al. (1996) testaram diversos meios de cultivo com diferentes composições em fermentações de vários fungos filamentosos. No entanto, o meio sintético (descrito no tópico 3.2.3) utilizado neste trabalho foi selecionado como o meio que se mostrou mais promissor para a produção de lipase pelo fungo *P. simplicissimum* em FS.

Testes de produção de lipase e protease foram conduzidos, quantificando-se as atividades em tempos descritos na literatura como sendo picos da atividade lipásica. Duarte (2012), utilizando o mesmo meio sintético e

o fungo *P. simplicissimum*, obteve cerca de 2 U/mL para a atividade lipásica em 96h de fermentação. Enquanto Gutarra et al. (2009), utilizando um meio constituído de 2,5%(m/v) de torta de babaçu em água destilada, obteve 2,8 U/mL em 96h. Desta forma, o tempo de 96h foi adotado para ambos os sistemas fermentativos.

As atividades proteásica e lipásica obtidas em 96 h de FS com o meio sintético como meio de cultivo e de FS com 2,5%(m/v) de torta de babaçu em água destilada podem ser observadas na Figura 4.5.

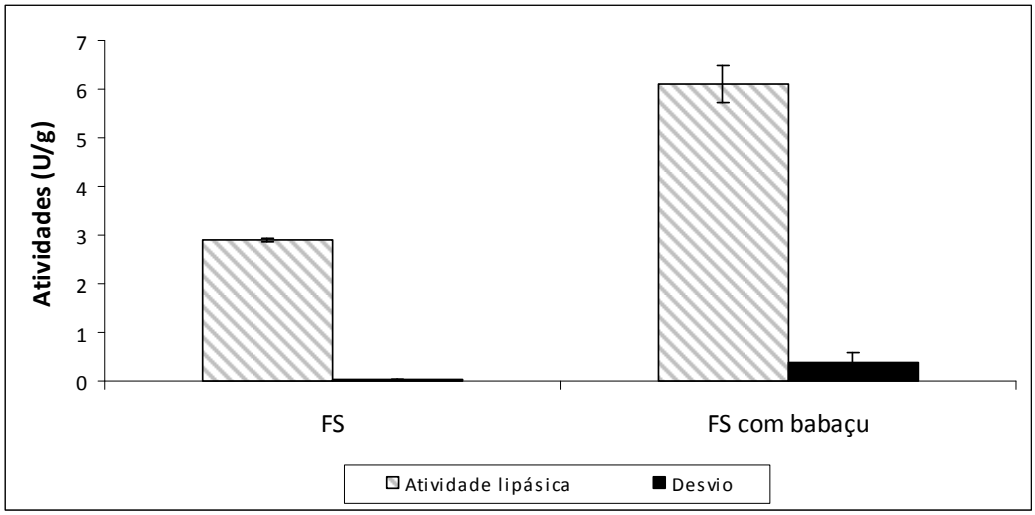

Figura 4.5: Atividades lipásica e proteásica, em 96 h de fermentação com meio sintético (FS) e com 2,5% de torta de babaçu (FSB).

Na Figura 4.5 pode-se notar que na FS utilizando apenas o meio sintético o fungo não produziu proteases em 96h e a atividade lipásica chegou a 2,9 U/mL. Na fermentação com meio FSB no entanto, produziu-se 2,4 U/mL de atividade proteásica e 6,1 U/mL de atividade lipásica, dando uma relação de aproximadamente 0,4:1 (protease:lipase). Tal resposta de produção enzimática indica que provavelmente a torta de babaçu estava induzindo a produção de proteases, uma vez que no meio sem a presença desta não houve produção de proteases.

A produção de lipases sem a presença de proteases permitiu que fossem feitos testes de hidrólise termofílica, apresentados no item 4.4, e posterior biodegradabilidade anaeróbia com o objetivo de avaliar se a presença de proteases em excesso no meio poderia causar a hidrólise do lodo, levando à

redução dos micro-organismos e consequentemente da produção de metano e do consumo de DQO. Ou ainda, verificar se as proteases poderiam hidrolisar as lipases presentes no *pool* enzimático, levando à adsorção de óleos e graxas na superfície do lodo e prejudicando sua atuação. Tais testes podem ser encontrados no item 4.5.2.

4.3. Testes de hidrólise do efluente

4.3.1. Testes de hidrólise utilizando a torta 1

Testes de hidrólise com o efluente sintético de pescado foram realizados conforme descrito no tópico 3.2.5. Anteriormente, Valente et al. (2010) estudou a hidrólise do efluente de indústria de pescado contendo 1500 mg O&G/L com 0,2%, 0,5% e 1,0% (m/v) de PES cuja atividade era de (134 ± 7U/g) a 30°C por até 18h. A condição de hidrólise que resultou nas melhores produções de metano foi a que utilizou 0,5% de PES (67 U para cada 100mL de efluente ou 0,67 U/mL de efluente) em 8 h de hidrólise. Nesta condição a autora obteve uma produção de 4,7 µmol/mL de ácidos livres.

Como não havia nenhum trabalho anterior do grupo de pesquisa que avaliando a hidrólise termofílica de efluentes, foi necessário o estudo dos tempos de hidrólise e da produção de ácidos livre com a utilização do PES. Sendo assim, foram feitos testes iniciais de hidrólise com o PES proveniente da torta 1 para uma concentração inicial de lipase de 0,67U/mL de efluente.

Primeiramente, os testes foram feitos com a utilização de 0,1g/L de azida sódica, a fim de inibir a atividade microbiana e o consumo dos ácidos livres produzidos durante a hidrólise pelos micro-organismos presentes no efluente (VALENTE, 2009; SILVA, 2011). Desta forma, é possível avaliar a produção de ácidos livres ao longo do tempo, uma vez que os micro-organismos presentes no efluente, como já foi observado por Leal et al.(2002), podem utilizar os ácidos graxos liberados na hidrólise como substrato, reduzindo sua concentração no meio.

Os seguintes testes foram realizados:

1) Utilização de 0,67U/mL de efluente + 1% (m/v) de azida (PES + azida)

2) Utilização de 0,67U/mL de efluente (PES)

3) Efluente puro sem a adição de PES (Controle)

Como o tempo ideal de hidrólise ainda não havia sido determinado, todas as condições foram avaliadas para os tempos de 0, 4, 8, 16, 20 e 24 horas de hidrólise nos quais foram retiradas alíquotas para o monitoramento dos ácidos livres. Os resultados dos perfis de hidrólise nestes testes podem ser observados na Figura 4.6.

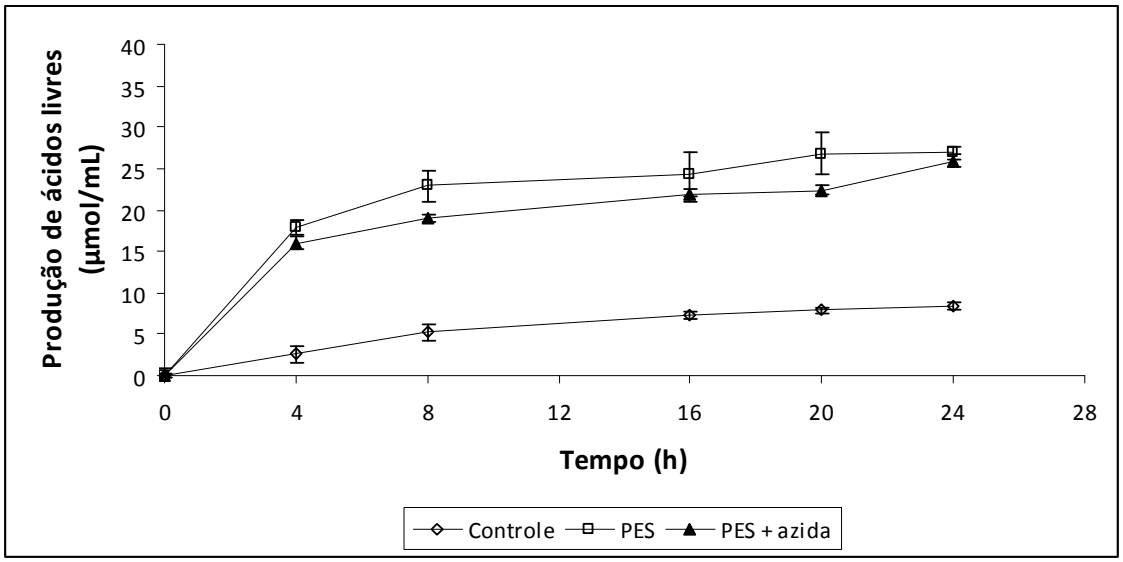

Figura 4.6: Variação do teor de ácidos livres com o tempo de hidrólise (50°C) de efluente de pescado sintético contendo 1500 mg O&G/L.

Percebe-se, na Figura 4.6, que houve um aumento da concentração de ácidos livres produzidos devido à adição do PES nas duas condições, com e sem azida. É possível observar também que as curvas de produção de ácidos livres com e sem azida apresentaram comportamento similar, o que indica que possivelmente os micro-organismos presentes no efluente não possuem atuação significativa na decomposição do mesmo à temperatura de 50°C. Como o efluente sintético é composto apenas de água e sardinhas, a maior parte dos micro-organismos nele presentes fazem parte da biota do próprio peixe. As partes utilizadas para produzi-lo, tais como as vísceras e cabeças, são as porções responsáveis pela maior parte da biota de bactérias, que

geralmente ficam concentradas nos intestinos e guelrras dos peixes (ARGENTA, 2012)

As sardinhas utilizadas na confecção deste efluente são provenientes do litoral brasileiro, ou seja, peixes de águas tropicais e, portanto, de temperaturas medianas. Argenta (2012) afirmou que a microbiota bacteriana encontrada nos frutos do mar acompanha os hábitos dos organismos nos quais vivem. Sendo assim, a maior parte das bactérias presentes nestes organismos seriam mesofílicos. O que se confirma ao se verificar que não há diferença significativa entre as curvas de produção de ácidos livres nas hidrólises a 50°C com e sem azida. A Tabela 4.2 mostra a produção de ácidos livres obtida nos tempos de 4 e 24 h para as 3 condições testadas.

Tabela 4.2: Produção de ácidos livres na hidrólise do efluente conduzida a 50°C em 4 e 24 horas.

Condição	**Variação de ácidos livres (µmol/mL)**	
	4h	**24h**
Controle	2,57	8,34
PES	17,81	26,86
PES + azida	16,02	25,93

PES – preparado enzimático sólido

Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 4.2, nota-se que os ácidos graxos produzidos em 24 h com a utilização do PES e do PES acrescido de azida foram semelhantes, concluindo-se que a utilização de azida nos estudos de determinação do melhor tempo e atividade enzimática para os testes de biodegradabilidade anaeróbia não é necessária.

Na Figura 4.6 e Tabela 4.2 pode-se perceber que em 4 h de hidrólise obteve-se a maior variação de ácidos livres para a atividade enzimática utilizada (0,67U/mL). Possivelmente, a hidrólise teve sua melhor variação em 4h devido à meia vida das lipases do fungo *P. simplicissimum* crescido em torta de babaçu que em pH 5 a 50°C é de 5h (GUTARRA, 2007).

No entanto, o valor de ácidos livres obtido (17,81 e 16,02 µmol/mL para o PES e o PES com azida, respectivamente) foi maior do que o obtido por Valente et al. (2010) utilizando a mesma quantidade de enzima na hidrólise a 30°C (4,7 µmol/mL). Considerando que nos níveis de ácidos graxos livres obtidos na hidrólise realizada por Valente et al. (2010) a biodegradabilidade anaeróbia do efluente apresentou resultados melhores comparados ao Controle (sem hidrólise), a atividade lipásica na hidrólise a 50ºC poderia ser reduzida a fim de se atingir menores níveis de ácidos livres.

Desta forma, ainda utilizando o PES obtido da torta 1, foram feitos testes de hidrólise com 0,32 e 0,16 U/mL de efluente, além do Controle sem adição de PES, medindo-se a concentração de ácidos livres nos tempos de 0, 4, 8, 16, 20 e 24 h de hidrólise. Os resultados dos perfis de hidrólise nestes testes podem ser observados na Figura 4.7.

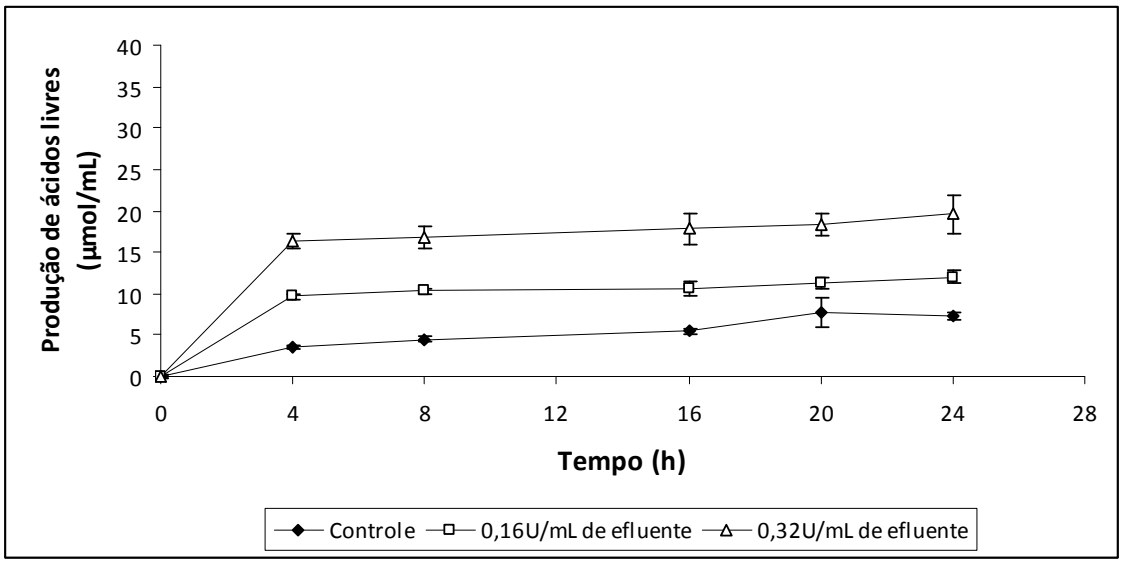

Figura 4.7: Variação do teor de ácidos livres com 0,16 e 0,32 U/mL e no Controle na hidrólise (50°C) de efluente de pescado sintético contendo 1500 mg O&G/L.

A maior variação de produção permanece no tempo de 4 h, conforme observado na Figura 4.6, sendo o pequeno aumento posterior devido, possivelmente, somente à ação da temperatura. O resultado obtido neste trabalho difere do encontrado por Leal et al. (2006) que realizou experimentos de hidrólise a 45°C e observou que até 24h a produção de ácidos livres continuava a crescer, diferentemente das demais temperaturas testadas em

seu trabalho (25 e 35°C) nas quais a produção de ácidos livres estabilizava em 12h.

As hidrólises com adição de PES alcançaram maior produção de ácidos graxos livres quando comparadas à condição Controle, sem adição de PES. Além disso, o aumento da concentração de PES e, portanto, da atividade, levou a maiores produções de ácidos graxos livres, como pode ser observado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Produção de ácidos livres em 4 e 24 h de hidrólise do efluente a 50ºC com diferentes atividades lipásicas e na condição Controle.

Condição	**Variação de ácidos livres (µmol/mL)**	
	4h	**24h**
Controle	3,5	7,30
0,16 U/mL de efluente	9,69	12,02
0,32 U/mL de efluente	16,43	19,59
0,67 U/mL de efluente	17,81	26,86

Nas duas últimas condições, apesar dos valores encontrados após 24 h de hidrólise diferirem, são obtidos valores semelhantes com 4 h de hidrólise. Tal fato indica que com 0,67 U/mL de efluente, provavelmente, o meio já se encontra saturado de enzima para a quantidade de gordura hidrolisável presente no efluente. A utilização de metade desta atividade (0,32 U/mL de efluente) mostrou resultados próximos aos valores obtidos anteriormente em 4h de hidrólise conforme pode ser visto na Tabela 4.3.

Valladão et al. (2007) utilizaram um *pool* enzimático de *P. restrictum* no tratamento de efluentes de abatedouros de aves com 1200 mgO&G/L e obtiveram uma variação máxima de 7,3 µmol/mL de ácidos livres em 22 h de hidrólise utilizando 1%(m/v) de PES. Leal et al. (2006), utilizando efluente de laticínio com 1000 mg O&G/L e 0,1% do mesmo PES, obteve com 24h de hidrólise a 35ºC um aumento no teor inicial de ácidos livres próximo de 8 µmol/mL. Valente et al. (2010), utilizando 0,5 % (m/v) do mesmo PES deste

trabalho, obteve 4,7 µmol/mL em 8 h de hidrólise na melhor condição de produção de biogás.

Neste trabalho, utilizando-se uma atividade de 0,16U/mL de efluente, a produção de ácidos graxos livres foi de 9,69 µmol/mL em 4 h de hidrólise. Tal resultado indica, pela avaliação dos resultados obtidos em trabalhos anteriores, que a quantidade de enzima ainda pode ser reduzida e que menores atividades enzimáticas podem levar a melhores condições de produção de metano.

4.3.2. Testes de hidrólise utilizando a torta 2

A partir deste momento outro lote de torta foi utilizado, denominado torta 2, cuja melhor condição de fermentação foi definida no item 4.2.2. Desta forma, foi necessário refazer as condições já estudadas, à exceção da atividade de 0,67 U/mL de efluente, que não seria interessante, pois representa elevada quantidade de enzima. Além das concentrações já estudadas, foram realizados testes com mais duas concentrações menores de enzima (0,08 e 0,04U/mL de efluente), haja visto que, pelos resultados obtidos com a torta 1, menores atividades enzimáticas podem levar a melhores produções de metano.

A Figura 4.8 mostra as cinéticas de produção de ácidos livres nos tempos de 0, 4, 8, 12, 20 e 24 horas com a nova torta de babaçu e a Tabela 4.4 apresenta a produção de ácidos livres em 4 e 24 horas de hidrólise para todas as condições estudadas.

É interessante notar que, apesar da mudança da torta, aparentemente os resultados se mostraram semelhantes, sendo as 4 primeiras horas de hidrólise responsáveis pela maior produção de ácidos graxos livres, assim como ocorreu nas hidrólises anteriores (Figuras 4.6 e 4.7). Entretanto, ao se avaliar os valores de ácidos livres produzidos, há uma mudança expressiva nos valores encontrados quando comparados aos valores obtidos com a torta 1 (Tabela 4.3). A quantidade de ácidos livres para a atividade de 0,32 U/mL de efluente, por exemplo, atingiu o valor de 9,7 µmol/mL em 4 h de hidrólise. Utilizando-se a torta 1, no entanto, o mesmo valor foi encontrado para 0,16 U/mL de efluente no mesmo tempo de hidrólise.

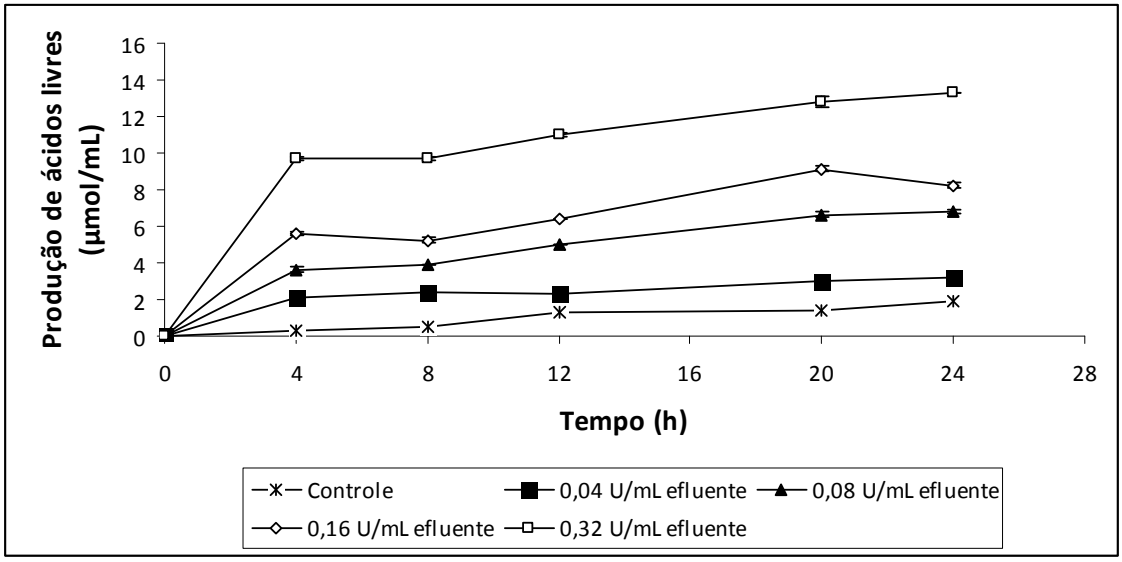

Figura 4.8: Variação do teor de ácidos livres com o tempo de hidrólise (50°C) de efluente de pescado sintético contendo 1500mg O&G/L utilizando diferentes concentrações de PES proveniente da torta 2.

Tabela 4.4: Produção de ácidos livres em 4 e 24 h de hidrólise do efluente a 50°C utilizando PES proveniente da torta 2 com diferentes atividades lipásicas e na condição Controle.

Condição	**Variação de ácidos livres (µmol/mL)**	
	4h	**24h**
Controle	0,28	1,87
0,04 U/mL de efluente	2,15	3,17
0,08 U/mL de efluente	3,64	6,81
0,16 U/mL de efluente	5,60	8,21
0,32 U/mL de efluente	9,70	13,34

Uma das hipóteses para esta variação é a presença excessiva de proteases no PES da torta 2 que pode estar determinando a degradação das lipases e impedindo sua plena atividade. Entretanto, ao se avaliar a produção de ácidos graxos livres do Controle na Tabela 4.4, em comparação aos valores obtidos nas Tabelas 4.2 e 4.3 com o PES da torta 1, nota-se uma queda significativa nos valores de ácidos livres obtidos para o Controle nestas hidrólises. Tal queda pode, provavelmente, ocorrer nos resultados de hidrólise

com a utilização de PES e pode ser proveniente de erro de leitura do eletrodo, que deve ser lavado a cada 45 amostras para garantir sua correta calibração e, portanto, uma leitura mais confiável.

Desta forma, após a recalibração do eletrodo, as hidrólises foram refeitas apenas com 0,16 e 0,32 U/mL de efluente até o tempo de 4 horas, por três vezes e em triplicata a cada vez. A faixa de variação na produção de ácidos livres em 4 h de hidrólise é apresentada na Tabela 4.5 a seguir.

Tabela 4.5: Produção de ácidos graxos livres após 4 h de hidrólise do efluente a 50ºC com PES proveniente da torta 2 e diferentes atividades lipásicas e na condição Controle.

Condição	**Variação de ácidos livres em 4 h (µmol/mL)**
Controle	1,64 ± 0,62
0,16 U/mL de efluente	4,71 ± 0,96
0,32 U/mL de efluente	6,60 ± 0,26

Aparentemente, com a limpeza do eletrodo do aparelho titulador, foi possível encontrar valores semelhantes aos encontrados anteriormente para o Controle. Entretanto, os valores observados para as atividades de 0,16 e 0,32 U/mL de efluente diferiram de forma relevante entre os PES obtidos com as tortas 1 e 2. Além disto, com a limpeza do eletrodo foi possível notar que para a atividade de 0,32 U/mL de efluente, há uma variação de 3 µmol/mL para menos do valor encontrado anteriormente utilizando a mesma torta 2. A diferença observada nos valores de ácidos graxos livres provavelmente se deve à ação de proteases que possuem uma atividade semelhante à lipásica, conforme dito anteriormente, podendo prejudicar a ação das lipases.

Como descrito anteriormente, os valores de ácidos graxos livres encontrados na literatura para as melhores condições de hidrólise e posterior produção de biogás variaram entre 4,7 e 8 µmol/mL para diversos tempos e tipos de efluentes, sendo o valor de 4,7 µmol/mL encontrado para o efluente de indústrias de processamento de pescado (Valente et al., 2010). Assim, considerando os resultados obtidos na Figura 4.8 e nas Tabelas 4.4 e 4.5,

chegou-se à conclusão de que as melhores atividades a serem empregadas em hidrólises anteriores aos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia seriam 0,16 e 0,32 U/mL de efluente e que o melhor tempo de hidrólise seria o de 4 horas, uma vez que neste tempo obteve-se a maior variação nos ácidos livres em todos os experimentos.

Com a definição dos parâmetros que seriam utilizados nos ensaios posteriores de biodegradabilidade anaeróbia, foi dada continuidade aos experimentos, conforme apresentado no item 4.5.1.

4.4. Avaliação da hidrólise termofílica com PEL produzidos nos meios FS e FSB

Uma vez que a atividade já havia sido determinada para o emprego de PES, esta foi mantida para os experimentos com PEL proveniente da fermentação com meio sintético e da fermentação com meio no qual foi utilizado babaçu (descritas no item 3.2.3). As quantidades de PES e PEL foram calculadas para garantir uma atividade lipásica inicial de 0,16 U/mL de efluente. Industrialmente, não há justificativa econômica para a utilização de fermentações submersas no tratamento de efluentes (CASTILHO et al., 2000a), sendo estes experimentos realizados a fim de comparar a aplicação de diferentes atividades protease na produção de metano.

Sendo assim, para realizar os ensaios de biodegradabiidade anaeróbia, antes era necessário que fosse feito o estudo da aplicação destas enzimas a 50°C a fim de se determinar o tempo ideal de hidrólise. A Figura 4.9 apresenta a produção de ácidos livres em hidrólises de efluente contendo 1500 mg O&G/mL, a 50°C, em 0, 4, 8, 12, 16 e 20 horas, com diferentes preparados enzimáticos provenientes de FS e FES, todas com atividade lipásica de 0,16 U/mL.

Observa-se que a maior variação da produção de ácidos livres se mantém em 4 h de reação como observado anteriormente e que os valores encontrados de produção de ácidos livres diferem de acordo com a condição empregada nas fermentações, sendo o maior valor obtido com a utilização de

PES. Uma possível explicação para tal resultado é que diferentes *pools* enzimáticos são produzidos ao se utilizar este mesmo fungo em FS e FES sendo que em FES pode ocorrer a expressão de várias lipases (SANTOS, 2010).

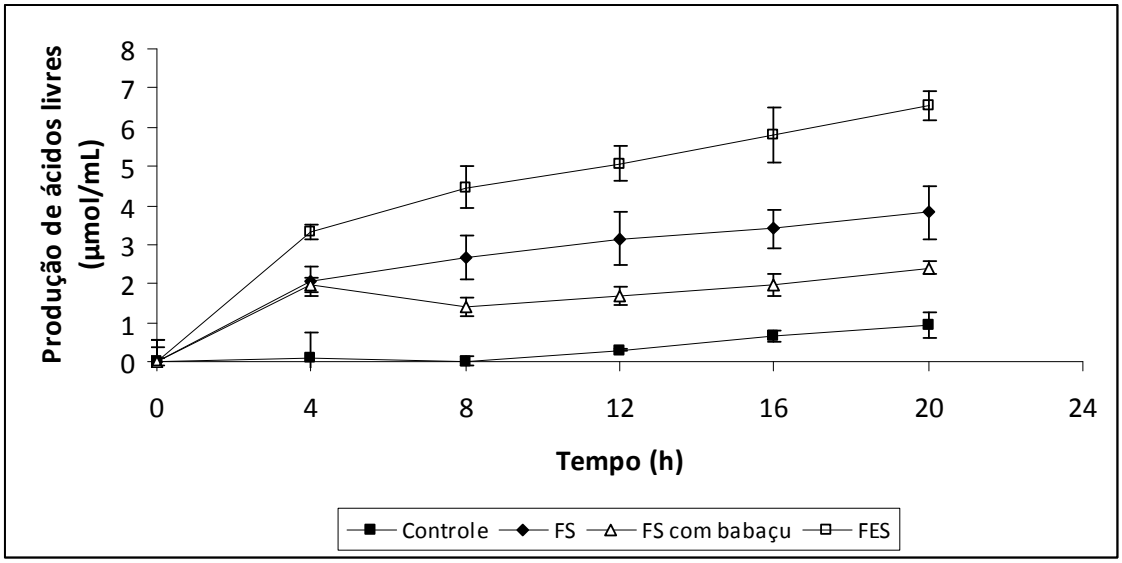

Figura 4.9: Produção de ácidos livres com o tempo de hidrólise a 50ºC com preparados enzimáticos provenientes de fermentação com meio sintético (FS), com torta de babaçu em água (FSB) e FES, todas com atividade lipásica de 0,16 U/mL.

Com a definição do tempo de hidrólise e da atuação dos diferentes *pools* enzimáticos a 50°C, foram realizados os testes de biodegradabilidade anaeróbia e produção específica de metano que podem ser observados no item 4.5.2.

4.5. Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia e produção específica de metano (PEM)

4.5.1. Teste com diferentes atividades lipásicas: 0,16 e 0,32 U/mL de efluente

Para atestar qual das duas condições de pré-tratamento enzimático seria a melhor escolha de atividade lipásica para as demais etapas do presente trabalho, foram feitos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia termofílica (50°C) em 3 bateladas consecutivas. Para tal, utilizou-se o *pool* enzimático obtido da torta 2 fermentada pelo fungo *P. simplicissimum* em hidrólises a 50°C com atividades lipásicas de 0,16 e 0,32 U/mL de efluente contendo 1500 mg O&G/L. Na condição Controle não houve pré-tratamento, sendo utilizado apenas o efluente bruto.

As Figuras 4.10 a 4.12 apresentam os perfis de produção de biogás durante os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia termofílica para as três condições testadas representando o primeiro, segundo e terceiro contatos do lodo anaeróbio com os efluentes, respectivamente. A medida do gás foi feita de 24 em 24 horas até a sua estabilização.

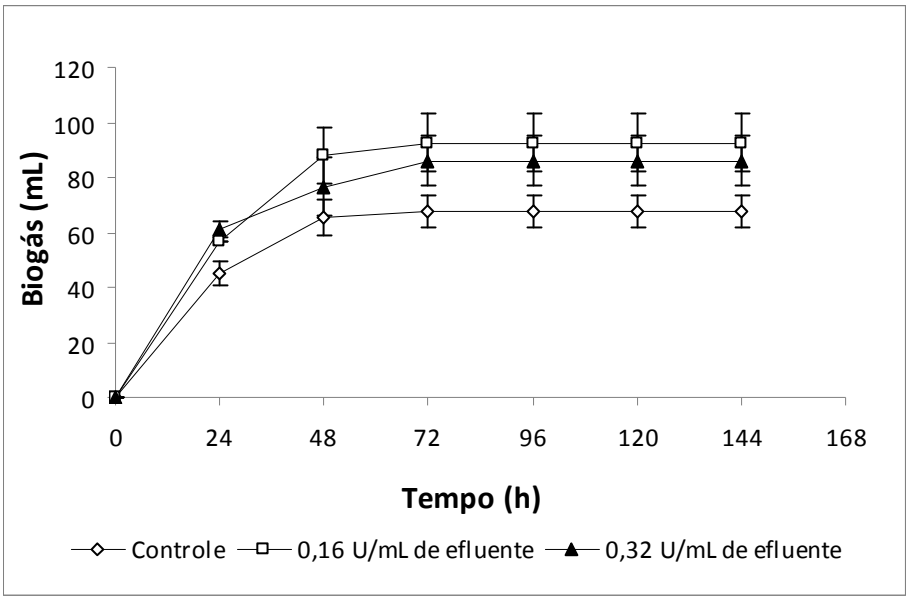

Figura 4.10: Perfil de produção de biogás a 50ºC na condição Controle e com efluente previamente hidrolisado com 0,16 e 0,32 U/mL de atividade lipásica: primeiro contato do lodo com o efluente.

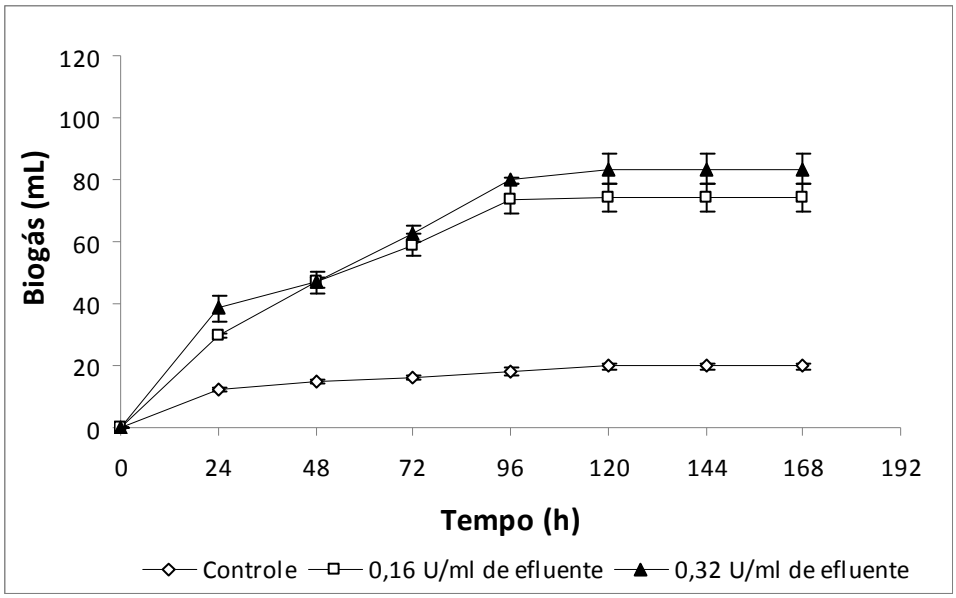

Figura 4.11: Perfil de produção de biogás a 50ºC na condição Controle e com efluente previamente hidrolisado com 0,16 e 0,32 U/mL de atividade lipásica: segundo contato do lodo com o efluente.

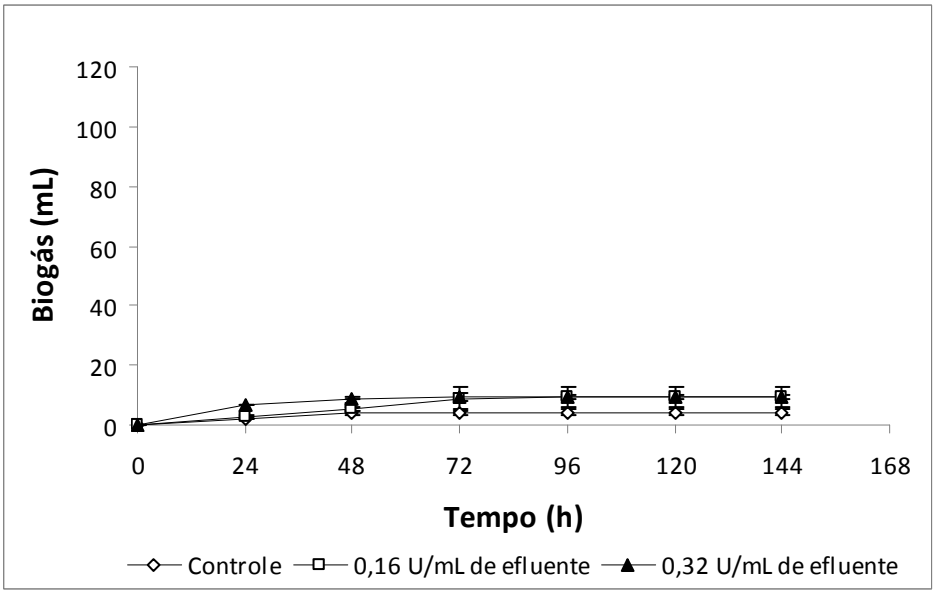

Figura 4.12: Perfil de produção de biogás a 50ºC na condição Controle e com efluente previamente hidrolisado com 0,16 e 0,32 U/mL de atividade lipásica: terceiro contato do lodo com o efluente.

Na primeira (Fig. 4.10) e terceira bateladas (Fig. 4.12) a produção de biogás estabilizou em 72 h, enquanto na segunda batelada (Fig. 4.11) a produção demorou mais a estabilizar, necessitando de 96 h. Este tempo foi

bem reduzido quando comparado, por exemplo, ao trabalho de Valente et al. (2010) que demorou cerca de 12 dias para a completa estabilização da produção de biogás a 30ºC.

A Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos após as 3 bateladas consecutivas com o efluente nas diversas condições apresentadas anteriormente.

Tabela 4.6: Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia termofílica para a utilização do PES da torta 2 com 0,16 e 0,32 U/mL de efluente e na condição Controle.

Condição	DQO Inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	Remoção de DQO (%)	Volume de biogás a 50°C (mL)	Percentual de Metano (%)	PEM média a 50°C (mL de CH_4/g DQO removida)
Primeira Batelada						
Controle	6580 ± 10	284 ± 8	95,3	67,3 ± 5,8	74,0 ± 0,3	88
0,16*	7220 ± 200	318 ± 10	95,0	92,5 ± 10,0	68,0 ± 0,2	101
0,32*	8065 ± 250	341 ± 10	95,2	86,0 ± 9,0	72,0 ± 0,2	89
Segunda Batelada						
Controle	5865 ± 10	1040 ± 5	82,3	19,8 ± 1,0	43,5 ± 0,1	20
0,16*	7780 ± 110	1045 ± 10	86,6	74,3 ± 4,5	93,0 ± 0,1	114
0,32*	8600 ± 100	1060 ± 10	87,7	83,5 ± 4,7	82,0 ± 0,2	101
Terceira batelada						
Controle	7845 ± 15	2454 ± 20	68,72	4,3 ± 1,5	33,3 ± 0,5	3
0,16*	7590 ± 210	1972 ± 35	74,02	9,3 ± 3,5	53,7 ± 0,7	10
0,32*	7770 ± 160	2440 ± 25	68,60	9,5 ± 0,5	40,4 ± 0,4	8

*** U/mL de efluente**; DQO - demanda química de oxigênio; PEM – produção específica de metano

Analisando-se os dados apresentados nas Figuras 4.10 a 4.12 e na Tabela 4.6, percebe-se que no primeiro contato do lodo com efluente contendo 1500 mg O&G /L, todas as condições avaliadas apresentaram remoções de

DQO e percentuais de metano produzido similares. No entanto, o Controle apresentou volume de biogás sempre menor que nos experimentos com efluente pré-tratado, embora a diferença tenha sido bem pequena, cerca de 22 mL no primeiro contato.

Já no segundo contato do lodo com o efluente, nota-se uma evidente queda no percentual de metano produzido no Controle, assim como no volume de biogás, diferentemente do que ocorreu para as demais condições nas quais houve o pré-tratamento enzimático. O Controle apresenta uma redução acentuada da produção de biogás, de 67,3, em média, para 19,8 mL (uma redução de 70,6%). Enquanto nos experimentos com efluente pré-tratado com 0,16 e 0,32 U/mL ocorre uma redução bem menor no volume de biogás produzido, de 22% e 3%, respectivamente. Estes resultados já eram esperados, pois no Controle há a adsorção de gorduras não hidrolisáveis na biomassa microbiana, o que prejudica a metabolização do material orgânico do efluente (ROLLÒN, 1999). Entretanto, nota-se que possivelmente há um acúmulo destas gorduras não hidrolisadas também nas demais condições testadas uma vez que há a diminuição na porcentagem de remoção de DQO em todas as condições.

No terceiro contato, apesar do Controle continuar mantendo produção de biogás menor que nos efluentes pré-tratados, a produção de biogás cai acentuadamente nas três condições avaliadas. Uma hipótese para tal resultado seria o acúmulo de gorduras no lodo anaeróbio em todas as condições testadas, pois houve uma diminuição significativa de todos os parâmetros avaliados em todas as condições.

Outra hipótese seria que, possivelmente, a hidrólise foi prejudicada pela presença de proteases que impediriam uma atuação adequada das lipases presentes no PES. Valladão (2009) observou um comportamento oposto ao deste trabalho, à medida que as bateladas eram feitas, a biomassa microbiana se tornava mais adaptada e, portanto, a produção de metano aumentava. Neste trabalho, no entanto, os resultados sugerem que o acúmulo de gordura supera a adaptação do lodo prejudicando a atuação destes micro-organismos na remoção de DQO e produção de metano. Além disto, as proteases podem estar atuando na redução da biomassa microbiana. Maeda et al. (2011) descobriram em seu estudo que a redução de lodo é minimizada com a

aplicação de inibidores de atividade proteásica e aumentada na presença de proteases, no caso secretadas por *Brevibacillus sp.*

A temperatura elevada é outro fator que pode ter interferido na produção de metano, pois a hidrólise termofílica pode liberar ácidos graxos de cadeia longa no meio reacional, conhecidos inibidores das arqueas metanogênicas (HATAMOTO et al., 2007; VALLADÃO et al., 2010).

Ainda assim, com os resultados encontrados foi possível chegar à melhor condição dentre todas testadas, sendo esta a de menor atividade enzimática. Em todas as bateladas, esta condição (0,16 U/mL de efluente) apresentou as melhores respostas de produção específica de metano – 101, 114 e 10 mL de CH_4/g DQO removida - quando comparada às demais. Além de representar uma redução de aproximadamente 4,2 vezes na quantidade de enzima utilizada anteriormente por Valente et al. (2010) no seu tratamento, o que diminui os custos do processo.

Além disso, esta condição foi a que mais se aproximou do valor teórico máximo de PEM esperado, que leva em consideração o aproveitamento de toda a matéria orgânica introduzida apenas para a formação de metano, que é de 414 mL CH_4/g $DQO_{removida}$ a 50°C. Valente et al. (2010), utilizando a melhor condição obtida pela autora em seus ensaios – 8h de hidrólise a 30°C utilizando 0,5% (m/v) PES – chegou ao valor de 216 mL CH_4/g $DQO_{removida}$ a 30°C. Este valor corresponde a 230 mL CH_4/g $DQO_{removida}$ a 50°C o que significa aproximadamente 56% do valor teórico máximo esperado. Porém, o valor de biogás alcançado foi maior (155 mL) do que o obtido no presente trabalho. Esta diferença pode ter acontecido devido à maior temperatura utilizada na hidrólise e nos ensaios de biodegradabilidade. Ou ainda ao efluente, uma vez que o efluente utilizado neste trabalho é sintético, enquanto o efluente utilizado por Valente et al. (2010) era industrial. Desta forma, uma comparação entre os dois trabalhos, utilizando o efluente sintético, torna-se necessária para uma melhor avaliação de produtividade.

4.5.2. Estudo da influência das proteases na PEM

Para analisar se o excesso de proteases no PES era prejudicial à etapa posterior de produção de metano foram utilizados 3 *pools* enzimáticos derivados de três diferentes sistemas fermentativos: fermentação submersa com meio sintético (FS), fermentação submersa com babaçu (FSB) e FES, descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4. Cada um destes *pools* enzimáticos possui três diferentes níveis de atividades proteásicas com relação às atividades lipásicas, previamente descritos nos tópicos 4.2.1 e 4.2.2.

A razão entre ambas as atividades enzimáticas (proteases:lipases) é maior no PES proveniente da FES (relação de 1,16:1), intermediária no PEL da FSB (0,4:1) e ausente no PEL proveniente da FS.

Sendo assim, mantendo-se a atividade lipásica em 0,16 U/mL de efluente para todos os *pools* enzimáticos obtidos, foi realizada a hidrólise termofílica no tempo ideal anteriormente determinado (4h). Os efluentes hidrolisados foram, posteriormente, conduzidos aos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia termofílica e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 4.7.

No experimento anterior, foram realizadas 3 bateladas consecutivas, observando-se uma queda significativa nos parâmetros avaliados na terceira batelada. Desta forma, neste experimento, foram realizadas 4 bateladas separadas duas a duas pelo tempo de uma semana para o que foi intitulado de "recuperação do lodo", pois acredita-se que possivelmente a temperatura pode auxiliar na solubilização/hidrólise das gorduras aderidas à biomassa.

Devido a este tempo de recuperação do lodo, verificou-se que a terceira e quarta bateladas se comportaram como a primeira e segunda bateladas, respectivamente, quando analisada a produção específica de metano para todas as condições. Tal fato pode ser observado também quando se analisa a produção de biogás e a PEM do Controle na primeira e terceira bateladas, que se mostram extremamente reduzidas quando comparadas às demais condições, apesar de haver uma boa remoção de DQO. No entanto, a metabolização de DQO pode estar sendo utilizada para outros fins que não a produção de biogás (SILVA, 2011) como, por exemplo, a formação de

biomassa. A remoção de DQO medida pode ainda não ser devido à metabolização da matéria orgânica, mas por adsorção e acúmulo na biomassa.

Tabela 4.7: Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia termofílica para as seguintes condições: Controle, FS, FSB e FES, todas com 0,16 U/mL de efluente.

Condição	DQO Inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	Remoção de DQO (%)	Volume de biogás a 50°C (mL)	Percentual de Metano (%)	PEM média a 50°C (mL de CH_4/g DQO removida)
Primeira Batelada						
Controle	3723 ± 40	307 ± 5	91,8	14,3 ± 3,5	85,1 ± 0,1	40
FS	4267 ± 64	440 ± 12	89,7	87,0 ± 8,4	88,9 ± 0,2	225
FSB	3477 ± 207	433 ± 48	87,5	43,3 ± 12,2	89,3 ± 0,1	141
FES	5107 ± 57	359 ± 14	93,0	97,5 ± 6,4	86,6 ± 0,1	198
Segunda Batelada						
Controle	5463 ± 200	615 ± 30	88,7	46,0 ± 7,1	89,5 ± 0,05	94
FS	4673 ± 74	606 ± 31	87,0	62,8 ± 8,1	89,3 ± 0,06	153
FSB	3917 ± 112	767 ± 19	80,4	41,9 ± 13,7	89,5 ± 0,03	132
FES	5907 ± 337	582 ± 3	90,1	60,7 ± 5,5	85,9 ± 0,04	109
Terceira batelada						
Controle	4552 ± 69	1219 ± 81	73,2	8,0 ± 0	82,9 ± 0,07	22
FS	6433 ± 115	1998 ± 30	68,9	50,5 ± 6,8	80,1 ± 0,09	101
FSB	4373 ± 326	1147 ± 32	73,8	56,5 ± 1,9	84,4 ± 0,05	164
FES	6075 ± 171	1174 ± 60	80,7	80,5 ± 1,0	81,3 ± 0,01	148
Quarta Batelada						
Controle	5822 ± 42	1199 ± 14	79,4	66,5 ± 4,8	84,8 ± 0,07	136
FS	6372 ± 25	1656 ± 18	74,0	61,3 ± 3,1	85,2 ± 0,56	123
FSB	5128 ± 67	1151 ± 5	77,6	52,0 ± 2,9	85,3 ± 0,09	124
FES	6517 ± 85	931 ± 7	85,7	68,5 ± 6,4	84,4 ± 0,02	115

DQO - demanda química de oxigênio; PEM – produção específica de metano

Os resultados de percentual de metano produzido foram semelhantes para todas as condições, inclusive para o Controle. Porém, ao se avaliar a remoção de DQO, a condição na qual foi utilizado o PES, proveniente da FES, foi a que obteve melhores resultados, estando sempre acima de 80%. Isto indica que, possivelmente, o preparado enzimático sólido contém um *pool* de enzimas com maior especificidade para os constituintes do efluente, auxiliando a biodegradabilidade do mesmo.

A utilização da FES pode não ter levado às maiores produções específicas de metano, mas resultou nas maiores reduções de DQO quando comparada às demais condições. No quarto contato, a FES apresentou menor PEM, porém, uma vez que os percentuais de metano e os volumes de biogás produzidos foram semelhantes nas diferentes condições, o fator determinante para diminuir ou aumentar os valores de PEM são os da remoção de DQO, de modo que quanto maior a redução, menor a PEM. Sendo assim, tal valor não sugere que o tratamento feito com PES da FES seja pior, ao contrário, a remoção de DQO é melhor, o que é de suma importância no tratamento de efluentes.

De modo geral, não foram observadas diferenças extremas entre uma condição e outra que justificasse a utilização da FS. E a grande quantidade de proteases não prejudicou o tratamento anaeróbio, o que permitiu que se continuasse utilizando o PES. Há de se considerar que os efluentes da indústria de pescado contêm uma relevante porção de matéria orgânica biodegradável composta principalmente por proteínas e lipídeos (GONZALEZ, 1996; LUCAS et al., 2000; ROLLÓN, 2002). Sendo assim, a presença de proteases é importante na hidrólise das proteínas presentes no efluente, assim como ocorreu com Mendes e colaboradores (2006). Ao tratar efluentes de laticínios ricos em gorduras e proteínas os autores observaram a hidrólise protéica devido à presença de proteases no preparado utilizado, proveniente de pâncreas de porco.

4.5.3. Cinéticas comparativas entre PEM e remoção de DQO

Valente et al. (2010) empregaram um efluente industrial em seu trabalho, o que pode ser prejudicial na comparação com o presente trabalho, uma vez que neste foi utilizado um efluente sintético. Como observado por Valladão et al. (2010), os efluentes apresentam diferenças quanto à inibição ou não da produção de metano pelas arqueas metanogênicas devido a presença de ácidos graxos livres de cadeia longa. Sendo assim, optou-se por repetir a melhor condição encontrada pela autora (Valente et al., 2010) e comparar com a melhor condição encontrada neste trabalho, empregando o efluente sintético.

O elevado consumo energético para manutenção da temperatura de 50°C durante o tratamento anaeróbio pode ser um fator limitante para a viabilização deste processo nas indústrias. Ao mesmo tempo, a utilização desta temperatura para uma hidrólise de apenas 4h pode ser viável, considerando que os efluentes industriais são gerados a elevadas temperaturas e vazões. Estas condições possivelmente garantiriam a manutenção da temperatura durante o tempo necessário à hidrólise.

Desta forma, sugeriu-se a realização de uma cinética mantendo-se a hidrólise a 50°C e verificando-se o tratamento anaeróbio a 30°C ou 50ºC para fins comparativos com as demais condições testadas neste e no trabalho de Valente et al.(2010). Assim, foram avaliadas três condições, a saber:

1) **Termofílica:** hidrólise e ensaios de biodegradabilidade anaeróbia a 50°C;
2) **Mesofílica**: hidrólise e ensaios de biodegradabilidade anaeróbia a 30°C;
3) **Hibrida**: Hidrólise a 50°C e ensaios de biodegradabilidade anaeróbia a 30°C.

Para realizar estas cinéticas, lodos pré-adaptados às condições temofílica e mesofílica foram submetidos a três bateladas consecutivas com o efluente hidrolisado tanto a 50°C quanto a 30°C no tempo e condições descritas no tópico 3.2.5 até que houvesse remoção de DQO acima de 80%. Sendo assim, os resultados apresentados neste tópico correspondem ao quarto contato do lodo com o efluente a 1500mg O&G/L, hidrolisado em cada

uma das condições, de maneira a comparar os três tratamentos com o mesmo PES e efluente.

A Figura 4.13 mostra a produção de biogás nas três condições (termofílica, mesofílica e híbrida) ao longo do tempo. Verifica-se que nos tratamentos híbrido e termofílico a produção de biogás estabilizou em torno de 68 h (2,8 d), diferentemente da condição mesofilica, que demorou cerca de 180 h (7,5 d) para a estabilização da produção de biogás. Valente et al. (2010) observaram a estabilização da produção de biogás nesta mesma condição em 12 d, o que provavelmente está relacionado ao emprego de um efluente industrial.

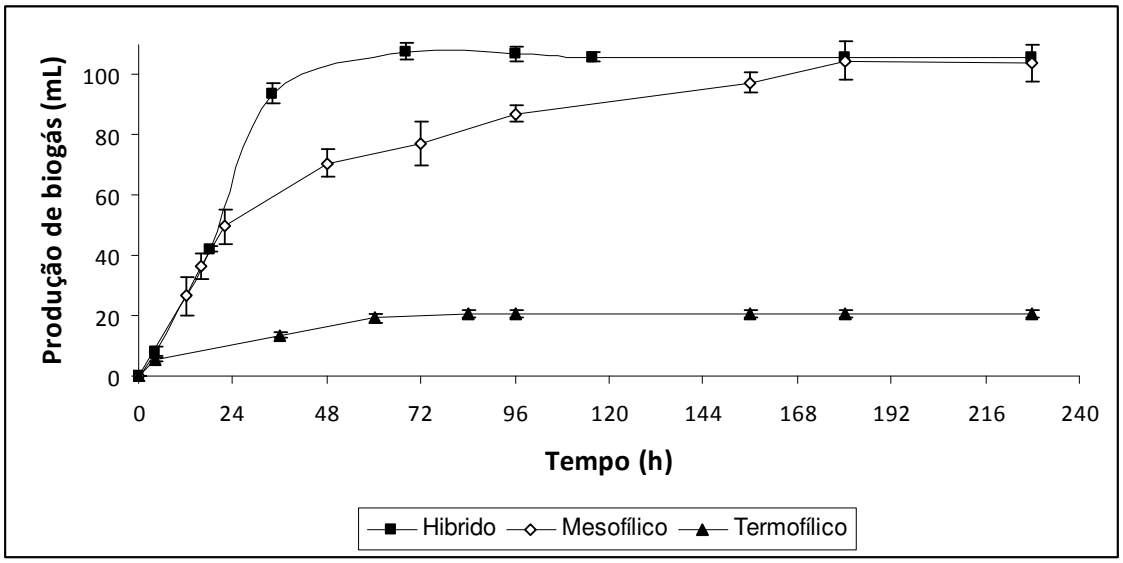

Figura 4.13: Produção de biogás ao longo do tempo nas condições mesofílica, termofílica e híbrida.

A condição termofílica, estudada inicialmente neste trabalho, não apresentou bons resultados, chegando a 20,9 ± 1,2 mL de biogás, dentre os quais 18,8 mL são metano. Conforme visto anteriormente no item 4.5.1, quando são feitas bateladas consecutivas a 50°C sem o tempo de "recuperação do lodo", na terceira batelada há uma drástica redução da produção de biogás, que se repete na quarta batelada e possivelmente em todas as conseguintes. Mesmo assim, o tempo de estabilização da produção de biogás continua curto quando comparado ao tempo exigido pelo tratamento puramente mesofílico.

O valor mais próximo de 3 d para a estabilização da produção de biogás foi obtido por Silva (2011) que, ao sexto dia de ensaio, verificou que não havia mais produção de biogás sendo os quatro primeiros dias responsáveis pela maior diferença de produção. Mendes et al. (2006), por sua vez, ao utilizar uma hidrólise de 12 h a 35℃ obteve a maior variação em 2 d de ensaio apesar de demorar 8 d para a estabilização da produção de biogás. A hidrólise dos triglicerídeos presentes no efluente e a conseqüente liberação dos ácidos graxos livres pode funcionar como um estímulo para os micro-organismos do lodo, acelerando o processo de tratamento anaeróbio (MENDES et al., 2006).

No caso do presente trabalho, apesar do tempo de hidrólise ser consideravelmente menor (apenas 4 h), a temperatura utilizada aumenta a velocidade da reação de hidrólise, possibilitando que em menos tempo haja a quebra dos triglicerídeos presentes no efluente em ácidos graxos livres e glicerol, que são moléculas mais simples de serem degradadas pelo consórcio microbiano acelerando o processo posterior de tratamento biológico anaeróbio. Percebe-se na Figura 4.13 que nas primeiras 24 h de degradação a 30ºC, os efluentes oriundos de hidrólises a 30ºC ou 50ºC mantêm a mesma velocidade de produção de biogás (cerca de 2,1 mL/h). No entanto, o efluente oriundo da hidrólise a 30ºC a partir daí reduz gradativamente a velocidade de produção de biogás até a estabilização em 180 h. Enquanto o efluente oriundo da hidrólise a 50ºC mantém a velocidade de produção de biogás por mais 20 h e estabiliza em seguida. Tal comportamento indica que a hidrólise a 50ºC libera mais produtos de mais rápida assimilação pela população microbiana, o que é de extrema importância para o processo de tratamento anaeróbio.

Observa-se que a condição hibrida apresentou os melhores resultados de produção de biogás – 106,0 ± 1,7 mL, sendo 95,5 mL de metano. Desta forma, uma maior temperatura de hidrólise permite produções de biogás tão altas quanto as encontradas na condição mesofílica – 104,1 ± 6,2 mL de biogás dos quais 93,8 mL são metano, porém em tempos reduzidos.

As Figuras 4.14 a 4.16 apresentam o decaimento de DQO e a produção específica de metano, calculada nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP) para que a comparação deste parâmetro se torne viável, ao longo do tempo nas três condições.

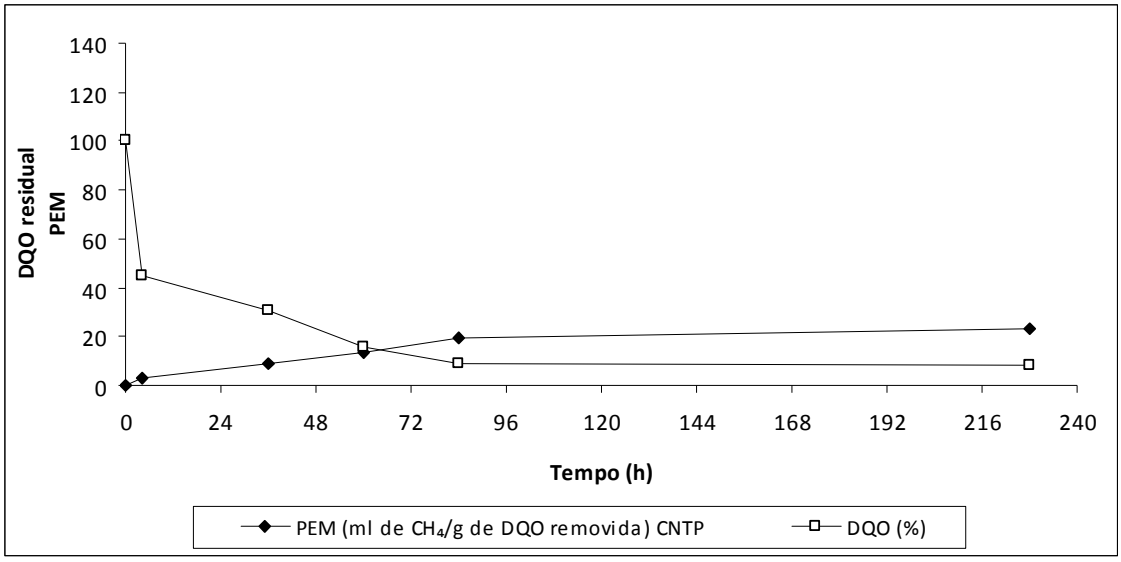

Figura 4.14: Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia na condição termofílica: produção especifica de metano (CNTP) e remoção de DQO ao longo do tempo.

Na Figura 4.14 são apresentados os resultados obtidos na condição termofílica, na qual observa-se que nas primeiras 4 h aproximadamente 55% da DQO foi consumida sem produção de metano. Tal resultado pode ser devido a uma rápida adsorção de matéria orgânica ao lodo, como observado por vários autores (VALENTE, 2009), que seria lentamente metabolizada. Uma outra hipótese a ser considerada é a de que uma baixa concentração de arqueas metanogênicas adaptadas a 50ºC tenha permanecido no lodo, coletado em um reator operando na condição mesofílica.

A máxima remoção de DQO (92%) foi atingida em 84 h, com uma PEM de aproximadamente 23,0 mL CH_4/ g $DQO_{removida}$, valor muito abaixo do valor teórico (350 mL CH_4/ g $DQO_{removida}$ nas CNTP).

Nas Figuras 4.15 e 4.16 podem ser observados os resultados obtidos para as condições mesofílica e híbrida, respectivamente. Embora tenham sido atingidos valores semelhantes ao final do tratamento, as cinéticas apresentaram comportamentos diferentes.

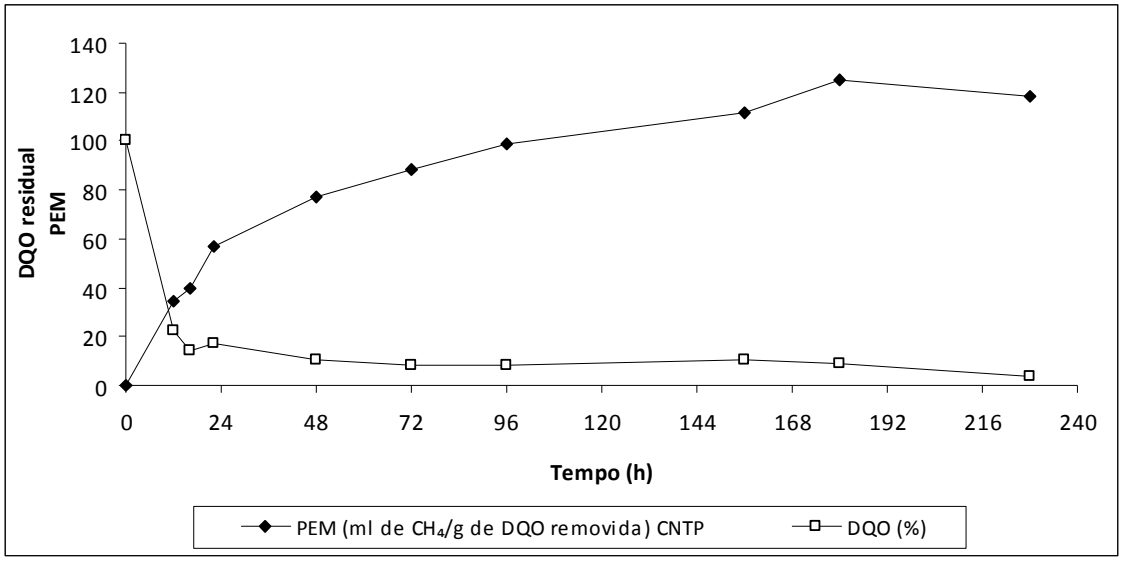

Figura 4.15: Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia na condição mesofílica: produção especifica de metano (CNTP) e remoção de DQO ao longo do tempo.

Nas primeiras 12 h de ensaio na condição mesofílica (Figura 4.15) ocorreu um decaimento de 77,9% da DQO, que atingiu 90,7% em 180 h e 96,2% em 228 h (9,5 d). Uma PEM máxima de 125 mL CH_4/ g $DQO_{removida}$ foi obtida em 180 h de ensaio. Valente et al. (2010), ao utilizar efluente proveniente de indústria de pescado na condição mesofílica, obteve 194,6 mL CH_4/ g $DQO_{removida}$ e um máximo de 93% de remoção de DQO. Isto indica que, possivelmente, os efluentes industriais podem ter componentes que auxiliam a conversão do material orgânico em metano.

A condição híbrida (Figura 4.16) apresentou PEM máxima de 110,6 mL CH_4/ g $DQO_{removida}$ em 228 h. No entanto, em apenas 68 h já havia atingido um valor de 105,4 mL CH_4/ g $DQO_{removida}$, diferentemente do que ocorreu na condição mesofílica (Figura 4.15) em que somente em 96 h valores próximos do máximo (98,6 mL CH_4/ g $DQO_{removida}$) foram atingidos. Quanto à remoção de DQO, em apenas 4 h de ensaio, a DQO residual chegou a 25% da inicial, o que significa uma redução de DQO de 75%. Em 28 h a remoção já havia atingido 93,3%, em 116 h atingiu o patamar de 97,85% chegando em 98,2% em 228 h. Em 68 h houve uma remoção de DQO de 97,5% e a PEM atingiu níveis próximos ao máximo obtido no tempo do ensaio. Sendo assim, um tempo de 68 h seria suficiente para que o efluente chegasse aos níveis desejados.

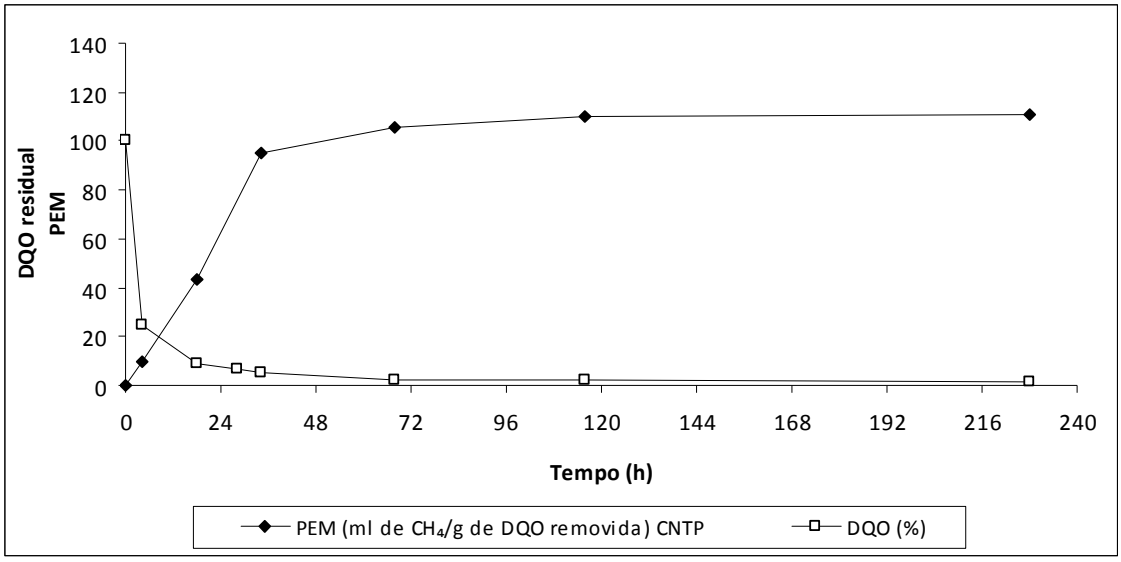

Figura 4.16: Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia na condição híbrida: produção especifica de metano (CNTP) e remoção de DQO ao longo do tempo.

Tais resultados, em conjunto com os observados na Figura 4.13, sugerem que o fator limitante para a diminuição do tempo de tratamento não está na biodegradabilidade anaeróbia termofílica, mas sim na hidrólise termofílica. Esta última provavelmente promove a liberação de componentes que auxiliam na biodegradabilidade do efluente e também na formação de metano, além de permitir a utilização de menores quantidades de enzima, uma vez que a atividade é reduzida.

Desta forma, os resultados observados nas cinéticas de PEM e remoção de DQO levam a crer que a hidrólise a 50°C, além de reduzir a atividade enzimática e diminuir o tempo de reação, pode ser a chave para a aceleração de um tratamento biológico anaeróbio mesofílico posterior, que por ser conduzido a temperaturas medianas não representaria aumento nos custos do processo. E poderá, inclusive, ser conduzido à temperatura ambiente, devido às condições ambientais brasileiras, que garantem uma temperatura elevada na maior parte do tempo. Mesmo que a temperatura de hidrólise tenha de ser mantida, possivelmente o maior consumo energético seria compensado com a diminuição do tempo do processo de tratamento como um todo. O que torna tal condição um importante alvo para estudos de escalonamento do processo visando sua posterior aplicação industrial.

5. Conclusões e sugestões

Ao final deste estudo, chegou-se às seguintes conclusões:

- Foi possível desenvolver um efluente sintético com características semelhantes aos efluentes industriais, utilizando cabeças, parte das escamas, vísceras, caudas e ossos de *Sardinella sp.*, espécie presente no litoral brasileiro.

- Testes preliminares de hidrólise enzimática com 1% de azida sódica possibilitaram avaliar que os micro-organismos presentes no efluente têm sua atividade metabólica reduzida a 50℃ e não apresentam significativo consumo de matéria orgânica nas condições de ensaio.

- A utilização da atividade enzimática ao invés da porcentagem de PES permitiu uma melhor reprodutibilidade dos testes realizados.

- Hidrólises realizadas a 50ºC mostraram que após 4h com 0,32 e 0,16 U/mL de PES obteve-se concentrações de ácidos livres dentro da faixa recomendada em vários trabalhos para melhores respostas no tratamento biológico anaeróbio posterior. Fator este que leva à relevante redução da quantidade de enzima, em comparação à hidrólise conduzida a 30ºC.

- Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia termofílica demonstraram que a menor quantidade de enzima avaliada (0,16 U/ mL) levou a maiores valores de PEM. Com o aumento no número de bateladas, ocorreu uma diminuição na remoção de DQO, produção de metano e também na PEM, sendo estes resultados mais agravados no Controle, no qual uma brusca redução na PEM ocorreu a partir da segunda batelada.

- A presença de altos níveis de protease no *pool* enzimático, aparentemente, não é responsável pela redução da PEM, mas provavelmente o acúmulo de gordura no lodo anaeróbio durante o tratamento.

- A PEM nos ensaios com pré-hidrólise e tratamento anaeróbio a 50°C foi maior que nos ensaios Controle. Apesar disto, os resultados obtidos sob condições termofílicas foram inferiores aos obtidos a 30°C. No entanto, ao se avaliar uma condição híbrida, na qual a hidrólise a 50°C foi mantida e o tratamento biológico anaeróbio foi conduzido a 30°C, obteve-se os mesmos resultados encontrados a 30°C, porém em 68 h de ensaio. O que indica que este tratamento pode ter relevância significativa para a aplicação em sistemas industriais.

Sugestões para trabalhos futuros seriam:

- Avaliar a aplicação de 0,08 U/mL de efluente em hidrólises termofílicas por 4 h e o posterior tratamento biológico anaeróbio a 30°C.

- Avaliar a melhor condição de hidrólise enzimática obtida com efluente industrial.

- Avaliar os efeitos e resultados da hidrólise termofílica e posterior tratamento em reatores UASB.

- Realizar análise econômica da condição de tratamento proposta em comparação ao tratamento convencional aplicado nas indústrias.

Referências

AGUILAR, C.N., AUGUR, C., FAVELA-TORRES, E., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., 2001a, "Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid state fermentations: influence of glucose and tannic acid!, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 26, p. 296 - 302.

AITKEN, M.D., 1993, "Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles" *The Chemical Engineering Journal*, v. 52 pp. B49 - B58.

ALEXANDRE, V.M.F. ; VALENTE, A.M. ; CAMMAROTA, M. C. ; FREIRE, D.M.G., 2011, "Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolyzed with a solid enzyme pool", *Renewable Energ*y, v. 36, p. 3439-3444.

ALOULOU A., RODRIGUEZ, J.A., FERNANDEZ, S., VAN OOTERHOUT, D., PUCCINELLI, D., CARRIÈRE, F., 2006, "Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies", *Biochimica et Biophysica Acta* v. 1761, p. 995 - 1013.

APHA, AWWA, WPCF, 2005, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 19th, edition, New York.

ARGENTA, F.F., 2012, Tecnologia de pescado: características e processamento da matéria prima. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto alegre, Brasil, 60p.

AZEREDO, L.A.I., GOMES, P. M., SANT'ANNA JR., G.L., CASTILHO, L.R., FREIRE, D.M.G., 2007, "Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentation. Current Microbiology" v. 54, p. 361 - 365.

BENDICHO, S., MARTÍ, G., HERNÁNDEZ, T., MARTIN, O., 2002, “Determination of proteolytic activity in different milk Systems”, *Food Chemistry*, v. 79, p. 245–249.

BERGE, J.P., 2007, “For a better use of marine by-products and wastes”, *FAO Fisheries Report*, v. 819, p. 103 -110.

BISEN, P.S., SANODIYA, B.S., THAKUR, G.S., BAGHEL, R.K., PRASAD, G.B.K.S. 2010. “Biodiesel production with special emphasis on lipase – catalyzed transesterification”. *Biotechnol Lett,* v:32 p. 1019 – 1030.

BJÖRKLING, F., GODTFEDSEN, S.E., KIRK, O., 1991, “The future impact of industrial lipases”, *TIBTECH*, v. 9, p. 360 - 363.

BLUNDI, C. E., UTIDA, M. M., 1997, “Utilização de enzimas na degradação aeróbia de substrato multicomposto”, *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2(3), p. 100-104.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 1984a, “RIISPOA: Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal”. Decreto 120691. Brasília.

BUHR, H. O. & ANDREWS, J. F., 1977, “The thermophilic anaerobic digestion process”, *Water Research,* v. 11, p. 129-43.

CAJAL, Y., SVENDSEN, A., BOLÓS, J., PATKAR, S.A., ALLSMA, M.A., 2000, “Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic properties of a fungal lipase”, *Biochimie*, v. 82, p.1053 - 1061.

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

CAMMAROTA, M. C. ; ROSA, DANIELA R. ; DUARTE, IOLANDA C.S. ; SAAVEDRA, NORA K. ; VARESCHE, M.B.A. ; ZAIAT, M. ; FREIRE, D.M.G., 2013, "The effect of enzymatic pre-hydrolysis of dairy wastewater on the granular and immobilized microbial community in anaerobic bioreactors", *Environmental Technology,* v. 34, p. 417-428.

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

CASTILHO, L. R., MEDRONHO, R. A., ALVES, T. L. M. 2000a. "Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger"*, *Bioresource Technology*, v. 71, p. 45-50.

CASTILHO, L. R., MEDRONHO, R. A., ALVES, T. L. M. 2000b. "Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations". Biochemistry Engineering Journal, v. 4, p. 239-247.

CAVALCANTI, E.D.C., GUTARRA, M.L.E., FREIRE, D.M.G., CASTILHO, L.R., SANT'ANNA JR, G.L., 2005, "Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors", *Braz. Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 79 - 84.

CAVALCANTI, E. D. C., MACIEL, F. M., VILLENEUVE, P., LAGO, R. C. A., MACHADO, O. L., FREIRE, D. M. G., 2007, "Acetone Powder from Dormant Seeds of Ricinus communis L.: Lipase Activity and Presence of Toxic and Allergenic Compounds", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136, p. 57 – 65.

CHAN, Y. J., CHONG, M. F., LAW, C. L. & HASSEL, D. G., 2009, "A rewiew on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater", *Chemical Engineering Journal*, v. 155, p. 1-18.

CHARNEY, J., TOMARELLI, R.M., 1947, “Azocasein method”, The *Journal of Biological Chemistry*, v. 171, p. 501 - 505.

CHEN, Y., CHENG, J.J., CREAMER, K.S., 2008, “Inhibition of anaerobic digestion process: A review”. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4044-4064.

CHERNICHARO, C. A. L., 2007, “Princípios do tratamento biológico de águas residuárias”, 2ª edição, v. 5: Reatores Anaeróbios. DESA/UFMG.

CHOWDHURY, P., VIRARAGHAVAN, T. E SRINIVASAN, A., 2010, “Biological Treatment processes for fish processing wastewater – A Review”, *Bioresource technology*, v. 101, p. 439 - 449.

CHOWDHURY, P., VIRARAGHAVAN, T., SRINIVASAN, A., 2010, “Biological tretment process for fish processing wastewater – A review”, *Biosource Technology*, v. 101, p. 439-449.

CONAMA, 2005. Resolução 357 de 17 de março de 2005.

CUNHA, A. G. , FERNÁNDEZ-LORENTE, G. , GUTARRA, M. L. E. ; BEVILAQUA, J. V., ALMEIDA, R. V., PAIVA, L. M. C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. ; GUISÁN, J. M. , FREIRE, D. M. G., 2009, “Separation and Immobilization of Lipase from *Penicillium simplicissimum* by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 156, p. 133 - 145.

DAMASCENO, Fernanda R.C. ; CAMMAROTA, M. C. ; FREIRE, D. M.G., 2012, “The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content”, *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* (Print), v. 95, p. 241-246.

DAO, V.T. E KIM, J.K., 2011, “Scaled up bioconversion of fish waste to liquid fertilizer using a 5L ribbon-type reactor”, *Journal of Environmental Management*, v.92, p. 2441 - 2446.

DEL VALLE, J.M., AGUILERA, J.M., 1990, “Recovery of liquid by-products from fish meal factories: a review”, *Process Biochemistry*, v. 25 (4), p. 122 – 131.

DELGADO, C.L., WADA, N., ROSEGRANT, M.W., MEIJER, S., AHMED, M., 2003 “The Future of Fish: Issue and Trend to 2020”. *International Food Policy Research Institute (Washington, DC) and the World Fish Center (Penang, Malaysia). Technical Report* v.62, 226p.

DÍAZ-GODÍNEZ, G., SORIANO-SANTOS, J., AUGUR, C., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., 2001, “Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 26, p. 271 - 275.

DHARMSTHITI, S., KUHASUNTISUK, B., 1998, “Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 75 - 80.

DUARTE, 2012, Produção e imobilização simultânea de lipase e morfologia do fungo *Penicillium simplicissimum* em fermentações submersas e no estado solido utilizando polipropileno, Monografia, Universidade Federal do Rio de janeiro, Instituto de Biologia, 42p.

DUTRA, J. C. V., TERZI, S. C., BEVILAQUA, J. V., DAMASO, M. C. T., COURI, S., LANGONE, M. A. P., SENNA, L.F., 2008, “Lipase production in solid state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 147, p. 63 – 75.

DZ – 205. R – 5, 1991. DIRETRIZ DE CONTROLE DE CARGA ORGANICAEM EFLUENTES LIQUIDOS DE ORIGEM INDUSTRIAL, Publicada no DOERJ em 24 de Outubro de 1991.

ECKENFELDER JR., W. W., 2000, "Industrial Water Pollution Control", 3ª Ed. McGraw-Hill, Boston, 584p.

EL-BELTAGY, A.E., EL-ADAWY, T.A., RAHMA, E.H. AND EL-BEDAWEY, A.A., 2005, "Purification and characterisation of an alkaline protease from the viscera of bolti fish (*Tilapia nilotica*)", *J Food Biochem,* v. 29, p. 445–458.

EIROA, M., COSTA, J.C., ALVES, M.M., KENNES, C., VEIGA, M.C., 2012, "Evaluation of the biomethane potential of solid fish waste" *Waste Management*, v. 32, p. 1347 – 1352.

FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R., 2000, "Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido", *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 81(1-2), p. 48 - 56.

FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R., 2008. "Lipases em Biocatálise" In: Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*. 1ª Ed, Rio de Janeiro: Editora Interciência*, v.1, p. 369-385.

FREIRE, D.M. G., TELES, E.M. F., BON, E. P. S., SANT`ANNA, G. L. JR., 1997, "Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: Media composition, agitation and aeration" *Applied Biochemistry and Biotechnology* v.63, p. 429 – 421.

GHOSH, S., 1987, "Improved sludge gasification by two-phase anaerobic digestion". ASCE. *Journal Environmental Enginering*, v. 113, p. 1265-1284.

GODOY, M.G., 2006, "Produção de lipases fungicas a partir de rejeitos da produção de biodiesel", Monografia, Universidade Federal do Rio de

Janeiro. Instituto de microbiologia Prof. Paulo Góes. Rio de Janeiro, Brasil, 65 p.

GODOY, M.G., GUTARRA, M.L.E., CASTRO, A.M., MACHADO, O.L.T., FREIRE, D.M.G., 2011, "Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste", *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, p. 945 - 953.

GODOY, M.G., 2009, "Produção de lipase microbiana e destoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais", Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de química. Rio de Janeiro, Brasil, 116 p.

GONZALEZ, J. F. 1996. "Wastewater treatment in the fishery industry", *FAO Fisheries Technical Paper.,* v. 355, Rome (Italy), Fisheries Dept.

GOTOR, V. F., BRIEVA, R., GOTOR, V. 2006. "lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals", *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic.* V:40, p. 111-129.

GRIEBELER, N., POLLONI, A.E., REMONATTO, D., ARBTER, F., VARDANEGA, R.,CECHET, J.L. et al., 2009, "Isolation and screening of lipaseproducing fungi with hydrolytic activity" *Food and Bioprocess Technology,* doi:10.1007/s11947-008-0176-5.

GUTARRA, M. L. E., GODOY, M.G., MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I., FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R., 2009, "Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation", *Bioresource Technology*, v.100, p. 5249-5254.

GUTARRA, M.L.E., GODOY, M.G., SILVA, J. N., GUEDES, I.A., LINS, U., CASTILHO, L.R. E FREIRE, D.M.G., 2009, "Lipase production and

Penicillium simplicissimum morphology in solid-state and submerged fermentations", *Biotechnology Journal*, v. 4, p.1450 - 1459.

GUTARRA, M.L.E., CAVALCANTI, E.D.C., FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA JR, G.L., 2005, "Lipase production by solid-state fermentation: cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121, p. 105-116.

GUTARRA, M. L.E. , 2003, "Produção de lipases por fermentação no estado sólido: seleção de fungos produtores e estudo das condições de cultivo", Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Rio de Janeiro, Brasil, 137 p.

GUTARRA, M. L.E., 2007, "Produção de lipase pelo fungo *Penicillium simplicissimum*: Caracterização do processo fermentativo e do produto e desenvolvimento de ciorreator para fermentação no estado sólido", Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Rio de Janeiro, Brasil, 155 p.

HATAMOTO, M., IMACHI, H., OHASHI, A., HARADA, H., 2007, "Identification and Cultivation of Anaerobic, Syntrophic Long-Chain Fatty Acid-Degrading Microbes from Mesophilic and Thermophilic Methanogenic Sludges" *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, pp. 1332 - 1340.

HÖLKER, U., HÖFER, M., LENZ, J., 2004, "Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi" *Applied Microbiology Biotecnology*, v. 64, p. 175 - 186.

HÖLKER, U., LENZ, J., 2005, "Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages?" *Current Opinion in Microbiology,* v. 8, p. 301 - 306.

ILLANES, A., 1994, “Producción de enzimas. Biotecnologia de Enzimas”, *Ediciones Universitarias de Val Paraíso*, v. 35, p. 45 - 54.

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION, February 2006, 2006, “Available at International Rules on Dumping of Wastes at Sea to Be Strengthened with Entry into Force of 1996 Protocol”, *IMO Briefing*, v. 22.

JAEGER, K.E., REETZ, T.M., 1998, “Microbial lipases from versatile tools for biotechnology”, *Trends in Microbiology,* v.16, p. 396 – 403.

JOHNS, M.R., 1995, “Developments in wastewater treatment in the meat processing industry: a review”, *Bioresource Technology*, v. 54, p. 203–216.

JUNG, F., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G., 2002, “Impact of enzymatic prehydrolisis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters”, *Biotechnology Letters,* v. 24, pp. 1797 - 1802.

KRISHNA, C., 2005, “Solid-State fermentation systems- an overview”, *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 25, p. 1-30.

KAMINI, N.R., MALA, J.G.S., PUVANAKRISHNAN, R., 1998, “Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake”, *Process Biochemistry*, v. 33, p. 505 - 511.

KODADADI, M., AZIZ, S., ST-LOUIS, R., KERNASHA, S., 2013. “Lipase – catalysed syntesis and characterization of flaxsud oil-based structured lipids”, *Journal of functional food*, v.5, p. 424 – 433.

LEAL, M.C.M.R., FREIRE, D.M.G., CAMMAROTA, M.C., SANT’ANNA JR., G.L., 2006, “Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater” *Process Biochemistry*, v. 41, p.1173 - 1178.

LETTINGA, G., HULSHOF P., ZEEMANG, W., 1996, “Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment”, Lecture Notes. Wageningen Agricultural University.

LIMA, A.C.F., 1996, “Produção de sulfeto em reator tipo UASB e sua potencial aplicação na remoção de metais pesados em efluentes” Dissertação (Mestrado), EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

LO, K.V., LIAO, P.H., MARCH, A.C., 1985, “Thermophilic anaerobic digestion of screened dairy manure” *Biomass*, v. 6, p. 301-315.

LUCAS, A. P. C., KOETZ, P. R., PRZYBYLSKI, S. L. A., 2000, “Tratamento anaeróbio de efluentes do processamento de corvine (Micropogonias furnieri) em reator UASB”, *Vetor*, v.10 (9), p.113-124.

MACEDO, G.A., LOZANO, M.M.S., PASTORE, G.M., 2003. “Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from Rhizopus sp..” *Journal Biotechnology,* v. 6, n. 1, p. 69-72.

MAEDA, A. T., YOSHIMURA, A. T., GARCÍA-CONTRERAS, B. R., OGAWA, I. H., 2011, “Purification and characterization of a serine protease secreted by *Brevibacillus sp*. KH3 for reducing waste activated sludge and biofilm formation”, *Bioresource Technology*, v.102, p. 10650 – 10656.

MAHADIK, N.D., PUNTAMBEKAR, U.S., BASTAWDE, K.B., KHIRE, J.M., GOKHALE, D.V., 2002, “Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation” *Process Biochemistry*, v. 38, p. 715 - 721.

MAMMA, D., KOURTOGLOU, E., CHRISTAKOPOULOS, P., 2008, “Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry”, *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2373– 383.

MANOEL, E. A. ; PAIS, KARLA C. ; FLORES, M. C. ; MIRANDA, L. S. M. ; COELHO, MARIA ALICE Z. ; SIMAS, ALESSANDRO B.C. ; FREIRE,

DENISE M.G. ; DE SOUZA, R.O.M.A. . “Kinetic resolution of a precursor for myo-inositol phosphates under continuous flow conditions”, 2013. *Journal of Molecular Cat*alysis*,* v. 87, p. 139-143,.

MASSÉ, L., KENNEDY, K. J., CHOU, S., 2001, “Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for oil particles in slaughterhouse wastewater”, *Bioresource Technology*, v. 77, p. 145 - 155.

MATSUMOTO, Y., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., REVAH, S., SHIRAI, K., 2004. “Production of β-N-acetylhexosaminidase of Verticillium lecanii by solid-state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer”. *Process Biochemistry*, v.39, p. 665-671.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA & GOVERNO FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2012, “Boletim Estatístico da Pesca e Agricultura – Brasil 2010”. Brasília, Ed. Carlton Tower, 128p.

MPA. Ministério da pesca e aquicultura, disponível em: http://www.mpa.gov.br. Acesso em: 25 fev. 2013.

MITCHELL, D.A., BEROVIC, M., KRIEGER, N., 2002, “Overview of solid state bioprocessing”, *Biotechnology Annual Review*. V. 8, p. 183 - 225.

NICOLUZZI, R., 1998, “Mercado Internacional de Pescado: Oportunidades brasileiras na Europa, América do Norte e Cone Sul. Higiene Alimentar”, v. 28 (7), p. 5-6.

NT – 202. R-10, 1986. CRITÉRIOS E PADRÕES PARA LANÇAMENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS, Publicada no DOERJ em 12 de Dezembro de 1986.

ONU BRASIL. Organização das nações unidas, disponível em http://www.onu.org.br/rio20/img/2012/01/rio92.pdf. Acesso em: 10 jan. 2013.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D., 2000, “New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products”, *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153 - 1169.

PARQUES, F.W., MACEDO, G.A., 2006, “Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais: A Review”, *Química Nova*, v.29(1), p. 93.

PATIL, S.R., DAYANAND, A., 2006, “Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions”, *Bioresource Technology*, v. 97, p. 2054 – 2058.

PAYNE, G., 1997, “Enzymes in waste treatment and waste reduction”. Octavo Curso Avanzado de Processos Biotecnologicos – Biotecnologia Ambiental. Cuernavaca. México.

PORTAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, disponível em: http://www.estado.rs.gov.br. Acesso em: 02 Mar. 2013.

QUITAIN, A.T., SATO, N., DAIMON, H. AND FUJIE, K., 2001, “Production of valuable materials by hydrothermal treatment of shrimp shells” *Indust Engin Chem Res,* v. 40, p. 5885–5888.

RAI, A.K., SWAPNA, H.C., BHASKAR, N., HALAMI, P.M., SACHINDRA, N.M., 2010, “Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera” *Enzyme and Microbial Technology,* v. 46, p. 9 -13.

RODRIGUEZ, J.A., MATEOS, J.C., NUNGARAY, J., GONZÁLEZ, V., BHAGNAGAR, T., ROUSSOS, S., CORDOVA, J., BARATTI, J., 2006, “Improving lipase production by nutrient modification using *Rhizopus*

homothallicus cultured in solid state fermentation", *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2264 - 2269.

ROLLON, A. P., ZEEMAN, G., LUBBERDING, H.J., LETTINGA, G., ALAERTS, G.J., 2002, "Treatment of fish processing wastewater in a one- or two-step upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor" *Water Sci. Technol.*, v. 45 (10), p. 207–212.

ROSA, D. R. ; DUARTE, I. C. S. ; SAAVEDRA, N.K. ; VARESCHE, M. B. A. ; ZAIAT, M. ; CAMMAROTA, M. C ; FREIRE, D. M. G., 2009, "Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis", *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6170-6176.

ROSA, D. R., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G., 2006, "Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels and grease", *Environmental Engineering Science*, v. 23, p. 814 - 823.

RUSTEN, B., LUNDAR, A., EIDE, O., ODEGAARD, H., 1993. Cheical pretreatment of Dairy wastewater. *Water Science Technology*, v. 28 (2), p. 67 – 76.

SAXENA, R.K., GHOSH, P.K., GUPTA, R., DAVID-SON, W.S., BRADOO, S., GULATI, R., 1999. "Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry". *Current Science*, v. 77, p.101-115.

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

SANDHYA, C., SUMANTHA, A., SZAKACS, G., PANDEY, A., 2005, "Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation" *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2689 – 2694.

SANT'ANNA JR, G. L., 2010, "Tratamento Biológico de Efluentes: fundamentos e aplicações", Rio de Janeiro, RJ, Ed. Interciência, p. 418.

SANTOS, B. C. P., 2010. "Purificação e caracterização de lipases de *Penicillium simplicissimum* produzidas por Fermentação no Estado Sólido e Submersa." Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 97p.

SCHINK, B., 1997, "Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation". *Angwandte Chemie International*, v. 37, p. 1608 – 1633.

SECUNDO, F., CARREA, G., TARABIONO, C., GATTI-LAFRANCONI, P., BROCCA, S., LOTTI, M., JAEGER,K-R., PULS, M., EGGERT, T., 2006, "The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity" *Journal of Molecular Catalysis B*, v. 39, p.166 - 170.

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

SHIH, I.L., CHEN, L.G., YU, T.S., CHANG W.T. E WANG, S.L., 2003, "Microbial reclamation of fish processing wastes for the production of fish sauce", *Enzyme and microbial technology*, v. 33, p. 154 -162.

SILVA, J.N., 2011, Otimização da extração de lipase de *Penicillium simplicissimum* obtida por fermentação em estado sólido e aplicação na hidrólise de efluente com elevado teor de gordura. Monografia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de química. Rio de Janeiro, Brasil, 77p.

SILVA, R. G., BATISTA, M. A., 2003, “Processos industriais e sistemas de tratamento de efluentes na indústria de conserva de pescado: estudo de caso Coqueiro indústria de pescado”, Monografia (Especialização em Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 65p.

SINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., PATEL, A.K., LARROCHE, C., PANDEY, A., 2010, “Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases”. *Enzyme and Microbial Techology*, v. 46, p. 541 - 549.

SOUSA, J.S., CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D., ARANDA, D.A.G., FREIRE, D.M.G., 2010, “Application of lipase from the physic nut (Jatropha curcas L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* v. 65, p. 133 - 137.

SOUZA, F. R. de ; GUTTERRES, M. 2012 . “Application of enzymes in leather processing: a comparison between chemical and coenzymatic processes.” *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 29, p. 473-482.

SUN, F.; XU, Y.; WANG, W., 2009, “Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis”, *Bioresource Technology* , v.100(9), p. 2607 - 2612.

SVENSSON, I., HERNÁNDEZ, I., VIRTO, M., RENOBALES, M., 2006, “Determination of lipase activity in cheese using trivalerin as substrate” *International Dairy Journal*, v.16, p. 423 - 430.

THOMAS, A., ALLOUCHE, M., BASYN, F., BRASSEUR, R., KERFELEC, B., 2005, “Role of lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity”, *Journal Biological Chemistry,* v. 280, p. 40074 - 40083.

VALENTE, A. M., 2009, “Aplicação de enzimas hidrolíticas no tratamento biológico anaeróbio de efluente de indústria de pescado” Tese de Doutorado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 111p.

VALENTE, A.M., ALEXANDRE, V.M., CAMMAROTA, M. C. e FREIRE, D.M.G., 2010, Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano*. Ciência e Tecnologia de Alimentos,* v. 30 (2), p. 483 - 488.

VALLADÃO, A. B. G. ; CAMMAROTA, M. C. ; FREIRE, D. M. G. , 2011, “Performance of an Anaerobic Reactor Treating Poultry Abattoir Wastewater with High Fat Content After Enzymatic Hydrolysis”, *Environmental Engineering Science*, v. 28, p. 299-307.

VALLADÃO, A. B. G., FREIRE, D. M. G., CAMMAROTA, M. C., 2009, “Evaluation of different pre-hydrolysis times and enzyme pool concentrations on the biodegradability of poultry slaughterhouse wastewater with a high fat content”*, Water Science & Technology Water Supply*, v.60, p. 243 – 249.

VARGAS, G.D.L.P., TREICHEL, H., OLIVEIRA, D.; BENETI, S.C., FREIRE, D.M.G., DILUCCIO, M., 2008, “Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 83, p. 47 - 54.

VINIEGRA-GONZALEZ, G., FAVELA-TORRES, E., 2006, “Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression?” *Food Technology Biotechnology*, v. 44, p. 397– 406.

VINTILA, T., DRAGOMIRESCU, M., JURCOANE, S., VINTILA, D., CAPRITA, R., MANIU, M., 2009, “Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversin of lignocellulose to ethanol.” *Ramonian Biotechnology Lett.* V. 14, p.4275 – 81.

ZHANG, H., MU, H., XU, X., 2006, “Monitoring lipase catalyzed butterfat interesterification with rapessed oil by Fourier transform near-infrared spectroscopy”, *Analytical Bioanal Chemistry*, v. 386, p.1889 - 1897.

ZHOU, Y., TAKAOKA, M., WANG, W., LIU, X. e OSHITAL, K., 2013, “Effect of thermal hydrolysis pre-treatment on anaerobic digestion of municipal biowaste: A pilot scale study in China” *Journal of Bioscience and Bioengineering, in press*.