



**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**

Jaqueline do Nascimento Silva

Monografia em Engenharia Química

Orientadores:

Professora Magali Christe Cammarota

Doutora Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

Professora Denise Maria Guimarães Freire

Fevereiro de 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**

***Jaqueline do Nascimento Silva***

Monografia em Engenharia Química submetida ao corpo docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

---

Prof<sup>a</sup> Eliana Flávia Camporese Sérvulo – D.Sc – EQ-UFRJ

---

Dr<sup>a</sup> Alessandra Bormann Valladão Noronha – INPI

---

Prof<sup>a</sup>. Juacyara Carbonelli Campos – EQ-UFRJ

Orientada por:

---

Prof<sup>a</sup> Magali Christe Cammarota D.Sc – EQ-UFRJ

---

Prof<sup>a</sup> Denise Maria Guimarães Freire – D.Sc – IQ-UFRJ

---

Dr<sup>a</sup> Melissa Limoeiro Estrada Gutarra – D.Sc. – IMPPG-UFRJ

**Rio de Janeiro, RJ – Brasil**

**Fevereiro/2011**

Silva, Jaqueline do Nascimento

Otimização da extração de lipase de *Penicillium simplicissimum* obtida por fermentação em estado sólido e aplicação na hidrólise efluente com elevado teor de gordura/ Jaqueline do Nascimento Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola de Química, 2011.

vi, 77f

Orientadores: Magali Christe Cammarota

Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

Denise Maria Guimarães Freire

Monografia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2011

1. Lipases de *Penicillium simplicissimum* 2. Extração enzimática 3. Pré-hidrólise 4. biossurfatante 5. Tratamento anaeróbio de efluentes 6. Monografia (Graduação – UFRJ/EQ) 7. Magali Christe Cammarota, Melissa Limoeiro Estrada Gutarra e Denise Maria Guimarães Freire. I. Otimização da extração de lipase de *Penicillium simplicissimum* obtida por fermentação em estado sólido e aplicação na hidrólise efluente com elevado teor de gordura.

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família: meus pais, Mauricio e Wilma por sempre acreditarem e confiarem em mim e por sempre me ajudarem a realizar meus sonhos e atingir meus objetivos; ao meu irmão Vinicius, por todo seu companheirismo e amizade em todos os momentos que precisei e aos meus avós, Alice e Walmir, por todo o carinho.

Às minhas orientadoras Melissa Gutarra, Denise Freire e Magali Cammarota por tudo que me ensinaram, por toda confiança e apoio.

À todo o pessoal do LaBiM: ao Mateus, Joab e Bruno por tornarem o ambiente de trabalho um lugar ótimo; à Robertinha, Carol, Lívia, Val, Jaque 2, Lú, Fernandinha, Taís, Elisa e Grazi por todo carinho e amizade.

Aos meus amigos e orientadores Mel e Mateus, por tudo que me ensinaram nesses MUITOS anos de Iniciação Científica. Aprendi muito e serei eternamente grata por todo ensinamento e amizade.

Ao pessoal do LaMMP, em especial Rafa, Marcelo e Evelin por muito carinho, atenção e paciência, principalmente na etapa final do meu trabalho; à Paty, ao Luiz e ao Sérgio pela amizade.

À Aline Fernandez, por toda a logística do LaBiM.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia Ambiental - LTA, pela ajuda durante meu trabalho.

À Escola de Química e ao Instituto de Química, que contribuíram com a minha formação e realização deste trabalho.

À PETROBRAS pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

**Resumo da Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.**

**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**

Jaqueline do Nascimento Silva

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Magali Christe Cammarota

Dr<sup>a</sup> Melissa Limoeiro Estrada Gutarra

Prof<sup>a</sup> Denise Maria Guimarães Freire

As lipases produzidas por fermentação em estado sólido (FES) possuem uma gama de aplicações biotecnológicas, dentre elas a utilização em tratamento de efluentes com elevados teores de gordura. Devido às características da FES, a recuperação de enzimas extracelulares das partículas sólidas torna-se uma etapa importante no aumento da eficiência de todo o processo. Este trabalho teve como objetivos, a seleção de métodos de extração mais adequados para obtenção de lipase de *Penicillium simplicissimum* produzida por FES e sua aplicação no tratamento de efluente proveniente da indústria de abate de aves. Após análise do perfil de extração de lipase foi possível observar um aumento na extração até o tempo de contato de 40 minutos, não havendo diferença na recuperação da enzima após este tempo. Realizou-se um planejamento do tipo Plackett & Burman (PB) e posteriormente um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), com objetivo de otimizar as condições de extração desta enzima. Os resultados obtidos após a otimização realizada, neste trabalho, permitiram um aumento de cerca de 50% na atividade enzimática (U/mL) do preparado bruto, em relação ao valor encontrado nas condições iniciais (5 mL/g de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 , 35°C), tendo como condições de extração um volume de 3mL de tampão por grama de torta, 25°C e 0,5% m/v de Tween 80, pH 7,0, molaridade do tampão 0,1M e agitação de 200rpm. Desta forma, foi possível obter um extrato mais concentrado, que posteriormente foi utilizado na hidrólise enzimática de efluente da indústria de abate de aves, combinada ou não com um biossurfatante. Para a realização desta etapa foi utilizado um planejamento do tipo fatorial, obtendo um valor de 14  $\mu\text{mols/mL}$  de ácidos liberados, tendo como condições de ensaio um volume de 6,2 mL de extrato enzimático para 100mL de efluente, uma concentração de 0,4%p/v de biossurfatante (4,9g/L ramnolipideo) a uma temperatura de 34°C. No tratamento anaeróbio após a etapa de pré-hidrólise utilizando duas condições, um com alto teor de ácidos liberados (14  $\mu\text{mols/mL}$ ) e outro com valor médio (8  $\mu\text{mols/mL}$ ), obteve-se maior produção específica de metano no efluente com menor teor de ácidos liberados durante a hidrólise enzimática (161 mL de  $\text{CH}_4/\text{g DQO}$ ), enquanto que no efluente não hidrolisado não foi observado produção de metano devido ao elevado teor de O&G no efluente (2034mg/L).

**Palavras-chaves:** Lipases de *Penicillium simplicissimum*, fermentação no estado sólido, extração enzimática, pré-hidrólise, biossurfatante e tratamento anaeróbio de efluentes.

# Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Lipases</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Características gerais.....	4
2.1.2. Principais fontes .....	8
2.1.3. Aplicações .....	9
2.1.3.1. Indústria alimentícia .....	9
2.1.3.2. Indústria de detergentes .....	9
2.1.3.3. Indústria farmacêutica e de química fina .....	10
2.1.3.4. Produção de biodiesel .....	10
2.1.3.5. Tratamento de efluentes.....	10
<b>2.2. Fermentação em Estado Sólido</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3. Produção de Lipase por Fermentação em Estado Sólido</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4. Efluente de Abatedouros</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5. Sistemas de Tratamento de Efluentes</b> .....	<b>15</b>
<b>2.6. Sistema de Tratamento Anaeróbio</b> .....	<b>16</b>
<b>2.7. Enzimas no Tratamento de Efluentes</b> .....	<b>19</b>
<b>2.8. Tratamento Enzimático de Efluentes com alto teor de óleos e graxas (O&amp;G)</b> .....	<b>21</b>
<b>2.9. Utilização de Biossurfatantes no Tratamento de Efluentes</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Justificativa e Objetivos</b> .....	<b>26</b>
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1. Micro-organismo</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2. Fermentação em estado sólido</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3. Extração enzimática</b> .....	<b>28</b>
4.3.1. Determinação do perfil de extração de lipase .....	28
4.3.2. Seleção da solução de extração .....	29
4.3.3. Determinação das condições de extração da lipase .....	29
<b>4.4. Determinação da atividade lipásica</b> .....	<b>30</b>
4.4.1. Método espectrofotométrico .....	30
4.4.2. Método titulométrico.....	31
<b>4.5. Coleta e Caracterização do efluente e lodo</b> .....	<b>33</b>
<b>4.6. Hidrólise enzimática de efluente da indústria de abate de aves.</b> .....	<b>33</b>
4.6.1. Ácidos Livres.....	34
<b>4.7. Ensaio de biodegradabilidade anaeróbia</b> .....	<b>34</b>
4.7.1. pH .....	35
4.7.2. Demanda Química de Oxigênio.....	35
4.7.3. Volume e Composição do Biogás .....	36
<b>5. Resultados e discussão</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1. Perfil de produção de lipase</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2. Perfil de extração de lipase</b> .....	<b>38</b>

5.3. Efeito da solução de extração na recuperação e na estabilidade de estocagem da enzima .....	40
5.4. Otimização da extração de lipase utilizando planejamento experimental.....	42
5.5. Obtenção do extrato bruto para hidrólise enzimática de efluente da indústria de abate de aves .....	52
5.6. Determinação do tempo de hidrólise enzimática .....	53
5.7. Otimização da Hidrólise enzimática de efluentes da indústria de abate de aves....	55
5.8. Ensaio de biodegradabilidade anaeróbia .....	61
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>63</b>
<b>7. Etapas Futuras.....</b>	<b>64</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>65</b>

## 1. Introdução

A utilização de lipases vem aumentando progressivamente, uma vez que estas enzimas possuem a habilidade de catalisar reações de hidrólise e síntese, podendo apresentar régio- e enantio-seletividade (JAEGER *et al.*, 1999). As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (SHARMA *et al.*, 2001). Devido a estas características, as lipases vêm sendo utilizadas em diversas áreas, desde a indústria de detergentes até a farmacêutica e de química fina (SHARMA *et al.*, 2001).

Tradicionalmente, as enzimas de interesse industrial são produzidas por fermentação submersa (FS), porém a fermentação em estado sólido (FES) vem sendo utilizada para a produção de diversas enzimas devido às suas vantagens em relação à FS – como a utilização de rejeitos agro-industriais e a possibilidade de obter um produto mais concentrado.

Gutarra *et al.* (2009a) mostraram que na FES utilizando como matriz sólida a torta de babaçu o fungo é capaz de crescer não somente na superfície do material sólido, mas também no seu interior, degradando nutrientes complexos como lipídios e amido através de secreção de enzimas e, assim, consumindo seus respectivos monômeros. Na FES as enzimas extracelulares permanecem adsorvidas nos sólidos fermentados como uma fase líquida (MITCHELL *et al.*, 2002). Em alguns casos, as lipases podem ser aplicadas na forma de sólidos fermentados, como, por exemplo, na produção de biodiesel (SALUM, 2010) e no tratamento de efluentes com elevados teores de gordura (CAMMAROTA E FREIRE, 2006). Porém, na maioria dos casos as lipases são utilizadas na forma aquosa, seja na forma bruta ou concentrada, podendo posteriormente serem imobilizadas (LI E ZONG, 2010).

Desta forma, a extração da enzima produzida por FES pode ser considerada uma importante etapa, necessitando, assim, de um estudo mais aprofundado. A produção de lipase por FES vem sendo estudada por diversos autores com diferentes meios de cultura como torta de babaçu (GUTARRA *et al.*, 2009), farelo de trigo



(MAHADIK *et al.*, 2002), farelo de soja (DILUCCIO *et al.*, 2004) e rejeito de mamona (GODOY, 2009). Porém poucos são os estudos envolvendo extração de enzimas produzidas por FES e todos mostram que há necessidade de otimização desta etapa a fim de aumentar a produtividade e produzir extratos enzimáticos concentrados. O tipo de solução de extração, temperatura, taxa de agitação, relação sólido/ líquido, e pH foram os principais parâmetros estudados para a extração de xilanase (HECK *et al.*, 2005), pectinases (CASTILHO *et al.*, 2000) e proteases (AIKAT *et al.*, 2000). No caso da extração de lipase, produzida por fermentação em estado sólido do farelo de soja, o parâmetro temperatura foi o fator mais importante (VARDANEGA *et al.*, 2008).

Na área ambiental, muitos estudos relatam o uso de biossurfatantes para aumentar a interação água/óleo, acelerar a degradação de vários óleos por micro-organismos e promover a biorremediação de águas e solos (SANTA ANNA *et al.*, 2007). Para o tratamento de efluentes com alto teor de gorduras, gerados em muitas indústrias alimentícias, existem poucos trabalhos na literatura. Neste caso, o uso combinado de lipases e biossurfatantes poderia disponibilizar as gorduras e óleos para as enzimas melhorando o processo de hidrólise e, desta forma, facilitando a biodegradação pela microbiota no processo biológico, eliminando processos adicionais de pré-tratamento para remoção das gorduras e resultando em menores custos capitais e operacionais (NAKHLA *et al.*, 2003).

A avicultura é uma atividade industrial de grande importância para a economia brasileira. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de carne de frango com produção, em 2009, de 1.004.081 toneladas (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2009). Devido a essa elevada produção, os abatedouros passam a produzir grandes quantidades de resíduos sólidos e líquidos. Os efluentes gerados nos abatedouros de aves apresentam elevada concentração de matéria orgânica biodegradável, principalmente na forma de proteínas e lipídios.

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 precipitação de proteínas e gorduras. No entanto alguns problemas são observados, tais como: 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, *apud* VALENTE, 2009).

Como os efluentes da indústria de abate de aves apresentam apreciáveis teores de matéria orgânica facilmente biodegradável, os processos biológicos são os mais adequados para seu tratamento. Entretanto, alguns problemas são encontrados durante o tratamento anaeróbio de efluentes industriais que contêm altos teores de gordura (PETRUY E LETTINGA, 1997). Desta forma, o pré-tratamento enzimático de efluentes vem sendo empregado como alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais (KARAM E NICELL, 1997), sendo as lipases uma das classes de enzimas mais estudadas nesse sentido (SAXENA *et al.*, 1999; CAMMAROTA *et al.*, 2001; JUNG *et al.*, 2002; LEAL, 2000, 2006; ROSA *et al.*, 2006; VALLADÃO *et al.*, 2007).

Uma etapa de pré-tratamento com enzima e/ou biossurfatante pode reduzir significativamente o teor de triglicerídeos no efluente, permitindo uma melhor atuação da população microbiana em uma etapa posterior de tratamento biológico. Porém, esta etapa não deve representar um custo elevado para o processo, para tal devem ser utilizados processos com tecnologia simples e de baixo custo como, por exemplo, a produção de enzimas através do processo de fermentação em estado sólido (FES), que utiliza rejeitos agro-industriais como meio de cultivo (CAMMAROTA E FREIRE, 2006).

## 2. Revisão Bibliográfica

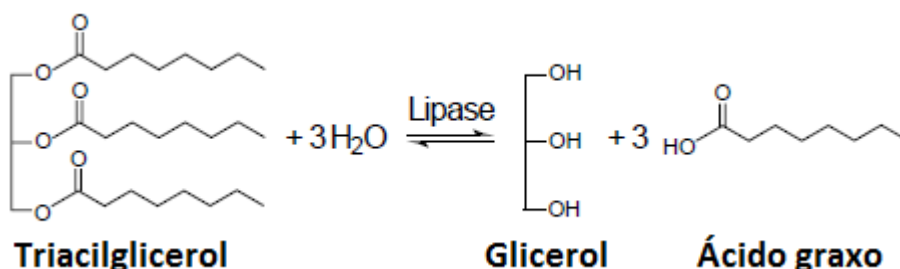
### 2.1. Lipases

#### 2.1.1. Características gerais

Cada vez mais se exige no mundo o uso de tecnologia limpa nos mais diversos processos industriais. Pensando em desenvolver processos considerados “verdes”, o uso de enzimas foi um dos caminhos escolhidos. As enzimas são catalisadores naturais, sendo a maior parte delas produzida por processos de fermentação. Os lipídios constituem grande parte da biomassa terrestre e as enzimas lipolíticas desenvolvem importante papel na sua hidrólise e, assim, a disposição destas moléculas para as células (HASAN *et al.*, 2006; FREIRE E CASTILHO, 2008).

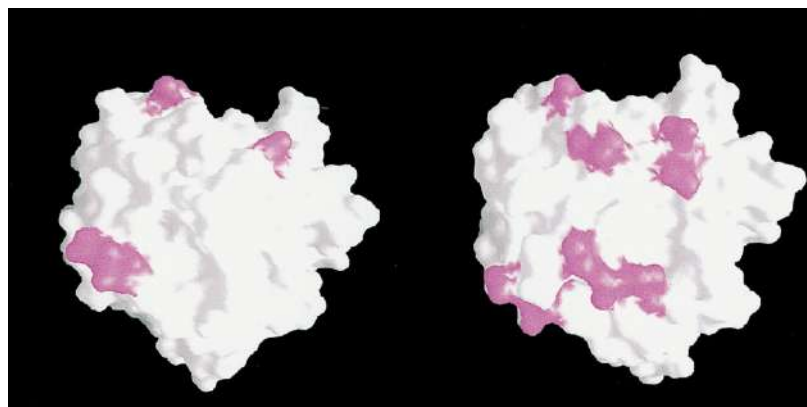
O mercado de lipases vem aumentando progressivamente devido às suas potencialidades biotecnológicas, principalmente à habilidade destas enzimas de catalisar diversas reações. Esta classe de biocatalisadores é encontrada em vegetais, animais e em micro-organismos. (TREICHEL *et al.*, 2009).

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) atuam geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise e a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (Figura 2.1) (SHARMA *et al.*, 2001), podendo apresentar régio- e enantio-seletividade (JAEGER *et al.*, 1999). Já em meios com baixa disponibilidade de água, estas enzimas possuem atividade reversa catalisando também reações de esterificação e transesterificação, entre outras.



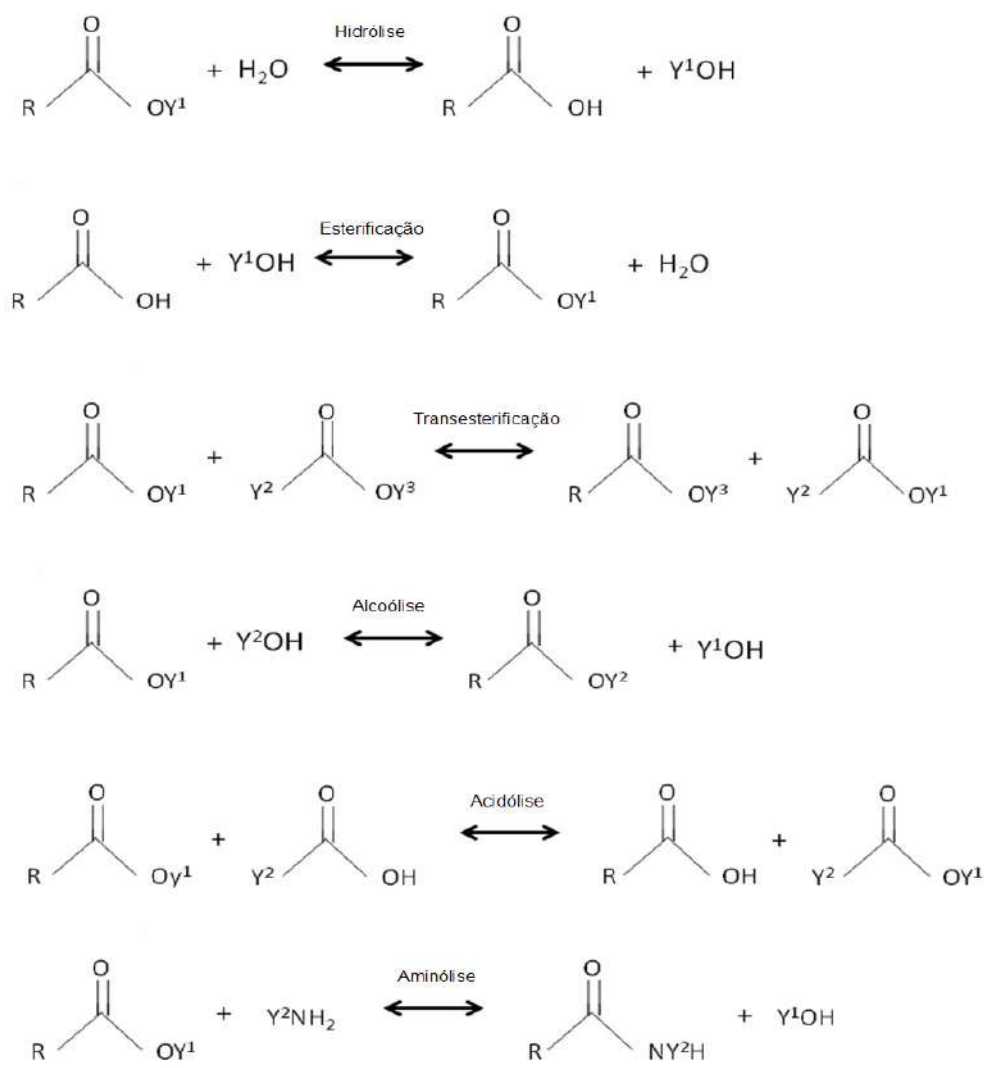
**Figura 2.1:** Reação da hidrólise e síntese do triacilglicerol catalisada por lipases.

As lipases apresentam elevadas concentrações de aminoácidos hidrofóbicos que ocupam posições estratégicas na estrutura conformacional da molécula, permitindo sua interação com substratos hidrofóbicos. Estes aminoácidos, porém, não conferem, por si só, um caráter hidrofóbico às lipases. Este caráter está associado à posição ocupada por estes aminoácidos na cadeia proteica. A partir da determinação das primeiras estruturas tridimensionais de lipases, pôde-se verificar que estas possuem o mesmo dobramento básico, conhecido como  $\alpha$ - $\beta$ -hidrolases. Embora as lipases tenham competência catalítica na forma cristalina, seus sítios ativos, formados pela tríade catalítica serina-histidina-aspartato/glutamato, não estão expostos na superfície das proteínas e são inacessíveis diretamente ao substrato. A maioria das lipases apresenta como característica a presença de uma estrutura helicoidal chamada de “tampa” responsável por cobrir o sítio ativo da enzima, o que faz com que este não tenha acesso ao substrato. As lipases têm como característica serem ativadas em interfaces água/lipídio devido à uma mudança conformacional que ocorre nesta região. Na presença de substâncias hidrofóbicas esta tampa se abre expondo a superfície hidrofóbica da enzima e tornando os resíduos catalíticos acessíveis ao substrato (JAEGER *et al.*, 1999; FREIRE E CASTILHO, 2008)(Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Estrutura 3D da lipase de *Rhizomucor miehei* com a tampa fechada (esquerda) e com a tampa aberta (direita). Em rosa apresentam-se os resíduos de valina, isoleucina e leucina que ficam mais expostos com a tampa aberta (Fojan *et al.*, 2000).

Os substratos mais comuns das lipases são os triacilgliceróis de cadeia longa que, quando hidrolisados, resultam na formação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Interesterificações, esterificações, alcoólises, acidólises e aminólises são outros tipos de reações catalisadas pelas lipases quando o meio reacional é aquo-restrito (Figura 2.3) (PARQUES E MACEDO, 2006). Esta enzima também é capaz de hidrolisar substratos sintéticos de diferentes tamanhos de cadeia, favorecendo sua utilização em diversos processos tecnológicos (FREIRE E CASTILHO, 2000, 2008).



**Figura 2.3:** Reações catalisadas por lipase (Parques e Macedo, 2006).

Acredita-se que o mecanismo cinético das lipases não dependa do tipo de reação catalisada (hidrólise, acidólise, esterificação). A reação inicia-se com o ataque nucleofílico ao carbono da ligação éster do lipídio susceptível pelo átomo de oxigênio

do grupo hidroxila do resíduo serina do sítio ativo, formando um complexo enzimático tetraédrico e havendo a liberação de álcool do lipídio, formando o intermediário acilenzima. Posteriormente, ocorre a hidrólise do complexo enzimático, regenerando a lipase. As etapas da reação catalisada pela lipase e seus intermediários são:

- 1 Ativação do resíduo nucleofílico serina da tríade catalítica da lipase pela histidina através da presença do lipídio. Ataque nucleofílico do carbono do grupo carboxílico pelo oxigênio da hidroxila do resíduo serina;
- 2 Formação de um intermediário tetraédrico através da ligação de quatro átomos ao carbono do grupo carbonila. Estabilização do intermediário pela interação com grupos NH do peptídeo. Doação de um próton da histidina para o álcool que está sendo liberado do substrato;
- 3 Formação da enzima acilada, na qual o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo serina; ativação de uma molécula de água pela histidina e ataque nucleofílico do íon hidroxila resultante ao carbono do grupo carbonila do intermediário;
- 4 Doação de um próton da histidina para o oxigênio do resíduo serina. A ligação éster entre a serina e o componente acila é quebrada e a enzima é regenerada.

Estas etapas encontram-se representadas na Figura 2.4.

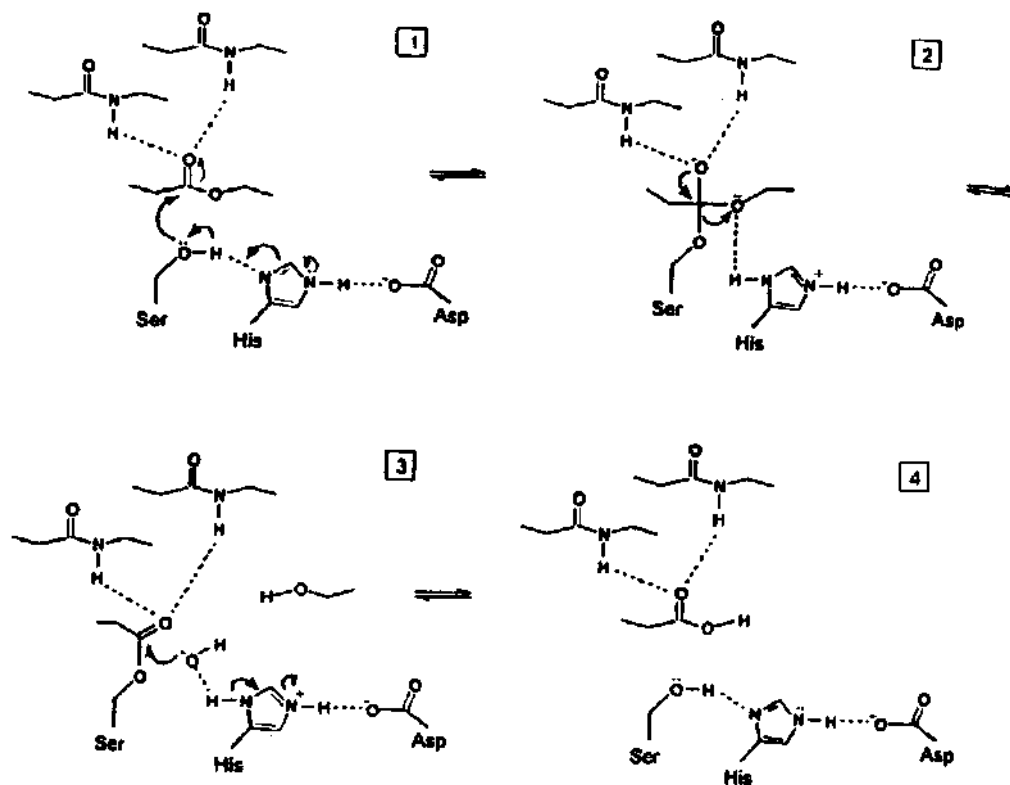


Figura 2.4: Mecanismo de reação das lipases (JAEGER *et al.*, 1999)

### 2.1.2. Principais fontes

As lipases são comumente encontradas na natureza em vegetais, animais e micro-organismos. Em animais, as lipases mais conhecidas e estudadas são as obtidas do pâncreas de porcos e de seres humanos (THOMAS *et al.*, 2005). Nesses organismos, elas estão envolvidas em vários estágios do metabolismo de lipídios. Em plantas, as lipases estão presentes em vegetais superiores como a mamona – *Ricinus communis* (CAVALCANTI, *et al.*, 2007), pinhão manso – *Jatropha curcas* (SOUSA *et al.*, 2010), sendo também encontradas nos tecidos de reserva de energia de diversas espécies (SHARMA *et al.*, 2001).

Para a produção industrial, os micro-organismos são a principal fonte uma vez que apresentam menor tempo de geração, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação genética de sua capacidade produtiva e das condições de cultivo (ILLANES, 1994). Tais micro-organismos despertam interesse biotecnológico por

produzirem diferentes tipos de lipases devido à diversidade de seu *habitat*. Estas enzimas podem apresentar diferenças em relação às faixas ótimas de pH e temperatura e especificidade quanto aos substratos.

### 2.1.3. Aplicações

Devido à sua versatilidade, as lipases apresentam diversas aplicações. Elas possuem muitas características que favorecem seu uso como catalisadores, tais como maior especificidade em relação a catalisadores químicos, diminuição do número de etapas de reação, menor consumo de energia e diminuição de problemas de separação de subprodutos (PANDEY *et al.*, 1999).

#### 2.1.3.1. Indústria alimentícia

Na indústria alimentícia estas enzimas vêm se tornando essenciais. As lipases são capazes de modificar as propriedades dos lipídios seja pelo tamanho da cadeia ou pelo grau de insaturação dos ácidos graxos ou pela posição dos mesmos no triglicerídeo, alterando assim suas propriedades organolépticas, físicas e seu valor nutricional (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 para enriquecimento de óleos vegetais (SOUSA *et al.*, 2010). Elas também desempenham um papel importante nas etapas de fabricação de embutidos, massas, laticínios (FREIRE E CASTILHO, 2008) e aromas pela hidrólise da gordura do leite (SAXENA *et al.*, 1999).

#### 2.1.3.2. Indústria de detergentes

Na indústria de detergentes, as lipases são utilizadas como aditivos por possuírem capacidade de hidrolisar gorduras de várias composições, apresentarem termoestabilidade, estabilidade em pH básico e resistência a surfatantes e à ação de outras enzimas (SHARMA *et al.*, 2001).



#### 2.1.3.3. *Indústria farmacêutica e de química fina*

Na indústria farmacêutica e de química fina as lipases são muito utilizadas na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos para a síntese de drogas quirais devido às suas características de enâncio seletividade (KATZ *et al.*, 1993; BERGLUND E HUTT, 2000).

#### 2.1.3.4. *Produção de biodiesel*

Atualmente, uma aplicação das lipases que tem gerado grande interesse é na produção de biodiesel. A produção do biodiesel consiste na transesterificação de óleos ou gorduras com álcoois de cadeias curtas, principalmente metanol e etanol, produzindo alquil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol em uma única etapa. A via química de produção de biodiesel a partir de óleos vegetais encontra-se bem estabelecida industrialmente, porém a utilização de uma via enzimática, catalisada especificamente por lipases, apresenta-se como uma alternativa interessante para reduzir os impactos ambientais.

#### 2.1.3.5. *Tratamento de efluentes*

As lipases são uma alternativa aos tratamentos convencionais, atuando no pré-tratamento de efluentes com elevados teores de gordura da indústria de alimentos (laticínios, abatedouros de aves e pescado) (CAMMAROTA E FREIRE, 2006).

A plena utilização industrial destas enzimas passa necessariamente pela redução dos custos de produção, principalmente em aplicações que demandam elevadas concentrações de enzimas e que o produto possua baixo valor agregado, como no caso do tratamento de efluentes (CAMMAROTA E FREIRE, 2006). Desta forma, o emprego da FES como sistema produtivo pode representar uma alternativa interessante para a produção de enzimas industriais a custos reduzidos (HÖLKER *et al.*, 2004; CASTILHO *et al.*, 2000b), devido principalmente à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultivo.

## 2.2. Fermentação em Estado Sólido

Os processos fermentativos podem ser de dois tipos: submerso ou em estado sólido. Uma das principais diferenças destes processos é a quantidade de água livre no meio de cultivo. Na fermentação submersa (FS), a quantidade de sólidos não ultrapassa 50 g/L, enquanto na fermentação em estado sólido (FES) o conteúdo de sólidos varia de 20 a 70% da massa total. Assim, a FES caracteriza-se pela ausência ou quase ausência de água livre no meio, onde a quantidade de água é próxima à máxima de absorção do material sólido, sendo o suficiente para permitir o crescimento do microrganismo (MITCHELL *et al.*, 2002).

A FES, tipicamente, emprega substratos naturais que atuam como fonte de nutrientes e de suporte para o crescimento dos micro-organismos (PANDEY *et al.*, 2000), podendo, desta forma, utilizar diversos rejeitos agroindustriais como meio de cultivo.

No campo de tratamento de efluentes os custos devem ser mínimos. Desta forma a FES torna-se uma alternativa para a produção das enzimas para emprego neste processo. Em trabalhos do grupo de pesquisa da UFRJ, foi demonstrado que a produção de lipase por *Penicillium restrictum* através de FES em torta de babaçu necessita de 78% menos investimentos em comparação com a FS (CASTILHO *et al.*, 2000b).

A FES apresenta uma série de vantagens, tais como a possibilidade de utilizar, por exemplo, resíduos agroindustriais como meio de cultivo, que são de baixo custo; apresentar condições semelhantes ao ambiente natural de fungos; ter reduzido risco de contaminação devido à baixa umidade; apresentar menor volume reacional; apresentar produtos mais concentrados e de fácil recuperação; e apresentar possibilidade do emprego de equipamentos de baixa complexidade, quando comparado à FS (RIVERA-MUÑOZ *et al.*, 1991). Entretanto, a FES pode apresentar algumas desvantagens como, necessidade de pré-tratamento do substrato; necessidade de grande quantidade de esporos; intensa mão-de-obra dependendo do tipo de reator; custo de energia elevado quando o substrato precisar ser agitado; dificuldade no monitoramento e controle de parâmetros, tais como a manutenção da temperatura e sistema heterogêneo (FREIRE E CASTILHO, 2000).

Os substratos sólidos utilizados na FES apresentam baixa condutividade. Este fator somado à baixa quantidade de água presente nesse processo formam gradientes de temperatura, umidade, substrato e produto. Tal problema não é observado em FS, devido à grande quantidade de água e agitação empregada (te BIESEBEKE *et al.*, 2002). Assim, um dos maiores problemas da FES é a geração de gradientes, principalmente de temperatura. Por outro lado, em FS a principal dificuldade operacional é a transferência de oxigênio para os micro-organismos, devido à baixa solubilidade do oxigênio em água. A transferência eficiente em FS é dependente do sistema de aeração utilizado, agitação, e tamanho e configuração do biorreator (DURAND, 2003). Já na FES, a transferência de oxigênio geralmente não é um limitante, com exceção de algumas configurações de biorreatores, pois, além de possuir uma fase líquida ao redor do substrato sólido, que permite a transferência de oxigênio, essa transferência pode ocorrer diretamente da fase gasosa, como no caso de fungos filamentosos (SCHUTYSER *et al.*, 2003).

Devido à baixa umidade na FES, um número limitado de micro-organismos é apto a realizar tal fermentação, sendo os principais os fungos filamentosos e as leveduras. No entanto algumas bactérias podem ser utilizadas (COUTO E SANROMÁN, 2006). Dentre os micro-organismos capazes de se adaptar à FES, os fungos filamentosos são os que possuem maior facilidade, devido principalmente ao seu crescimento em forma de hifas e às suas características fisiológicas. A penetração de hifas no interior das partículas faz com que os fungos filamentosos tenham uma maior acessibilidade aos nutrientes do que os micro-organismos unicelulares, reduzindo a distância em que os processos de difusão devem ocorrer. Isso é de grande importância, principalmente nos estágios finais da fermentação, quando os nutrientes da superfície encontram-se exauridos (MITCHELL *et al.*, 2002). Além disso, a maioria dos fungos possuem capacidade de crescer em meios com baixa atividade de água ( $A_w$ ) e baixo pH, e produzem enzimas extracelulares hidrolíticas para degradar as macromoléculas presentes no substrato sólido, favorecendo assim o seu uso em FES (RAHARDJO *et al.*, 2006).

Atualmente, a FES vem sendo empregada com diversas finalidades, como a produção de enzimas, aromas, produtos bioativos, biopesticidas, ácidos orgânicos e comidas fermentadas, assim como para a biorremediação e biodegradação de

compostos e detoxificação biológica de resíduos agroindustriais (PANDEY *et al.*, 2000; SOCCOL E VANDENBERGHE, 2003).

### 2.3. Produção de Lipase por Fermentação em Estado Sólido

As lipases microbianas são normalmente produzidas por fermentação submersa, entretanto, devido às vantagens apresentadas pela FES, como o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, este processo tem sido reportado como uma excelente alternativa para produção de lipases e outras enzimas, obtendo altas produtividades e redução dos custos de produção (CASTILHO *et al.*, 2000; HOLKER *et al.*, 2004). A produção de lipases por FES vem sendo estudada pelo Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) do Instituto de Química da UFRJ, a partir de diversos resíduos agroindustriais sendo produzida por diversos fungos do gênero *Penicillium*. Estudos recentes reportam a produção e aplicação de lipase de *P. restrictum* utilizando a torta de babaçu como meio basal (VALLADÃO, 2009), produção de lipases de *P. simplicissimum* no mesmo meio (GUTARRA, 2005 e 2007) e produção de lipase de *P. simplicissimum* em rejeito de mamona, com sua simultânea remoção de compostos tóxico e alergênicos (GODOY, 2009).

As lipases de *P. simplicissimum* produzidas por FES apresentam elevado potencial biotecnológico. Gutarra *et al.* (2009b) encontraram excelentes resultados como elevada produção e rendimento. Além disso, esta lipase mostrou ser termofílica e termoestável em pH entre 5,0 e 7,0 e temperatura de 50°C, tornando-a promissora para aplicações ambientais. Lipases de diferentes micro-organismos foram produzidas por FES utilizando diversas matrizes sólidas incluindo principalmente resíduos agroindustriais como o resíduo de mamona (GODOY *et al.*, 2009), a torta de babaçu (GUTARRA *et al.*, 2009b) e a torta de pinhão manso (SANTOS, 2010), empregando o fungo *P. simplicissimum*; farelo de trigo, utilizando os fungos *Rhizopus oligosporous* (UL-HAQ *et al.*, 2001), *Aspergillus niger* (MAHADIK *et al.*, 2002); bagaço de cana pelo fungo *Rhizopus homothallicus* (DÍAZ *et al.*, 2006), entres outros.

## 2.4. Efluente de Abatedouros

A atividade industrial gera grandes volumes de efluentes e resíduos sólidos que, quando descartados de maneira incorreta, podem causar graves danos ambientais. Algumas indústrias consideram o tratamento destes resíduos como um processo de alto custo e sem retorno financeiro. Porém, a matéria orgânica presente nestes resíduos pode ser tratada como um recurso, uma vez que pode gerar energia e materiais renováveis, obtendo-se um ganho econômico e ecológico (EDELMANN *et al.*, 2000).

Uma das principais atividades industriais do Brasil é a produção de alimentos. Dentre elas encontra-se o abate de aves, uma atividade de extrema importância para o Brasil, sendo em maior número no estado de São Paulo e na Região Sul do país. O Brasil fechou o ano de 2009 como o terceiro maior produtor mundial de frangos, atingindo a marca de 11 milhões de toneladas de carne de frango produzidas, sendo 3,6 milhões destinadas à exportação (UBA, 2009).

O abate de aves gera efluentes contendo elevados teores de matéria orgânica biodegradável, na maioria proteínas e lipídios (MASSE E MASSÉ, 2005). De acordo com SAYED *et al.* (1988) *apud* ROSA (2004), os lipídios representam menos de 1% da Demanda Química de Oxigênio (DQO) solúvel, porém mais de 67% da DQO particulada em efluentes de abatedouros. Os lipídios apresentam uma taxa de hidrólise menor em relação às demais frações orgânicas e, algumas vezes, prejudicam o tratamento biológico devido ao acúmulo de gorduras e sólidos na biomassa, levando à rápida deterioração da mesma (MASSE *et al.*, 2003). A Tabela 2.1 apresenta um resumo das principais características de efluentes de abatedouros de aves.

**Tabela 2.1:** Características de efluentes de abatedouros.

Características	Bezerra et al. 2002	Fuchs et al. 2003	Almutari <i>et al.</i> 2004	Masse e Massé 2005	Dors 2006	Del Nery <i>et al.</i> 2007	Saddoud e Sayadi 2007	Valladão 2009
pH	7,0	5,3-6,8	6,8±0,6	6,9±0,4	6,35	6,5-7,0	7,5-7,7	5,4±0,3
DQO	1766	5800-20150	-	7083±1211	6700	3102±688	7148-20400	10010±233
DBO	1049	2200-9800	-	-	4434	1780±543	3501±8030	638±17
O&G	359	-	18±9	168-379	2005	375±151	233-310	≤10
Sólidos Totais	-	2400-4700	-	1592-321	8390	2457±332	-	-
Nitrogênio Total	5,9	301-460	170±60	547±78	92	186±27	-	216±12
Fósforo Total	-	-	-	-	8,6	76±36	-	13,7±7,2

Fonte: Damasceno (2010).

## 2.5. Sistemas de Tratamento de Efluentes

Atualmente, está disponível uma grande variedade de técnicas para o tratamento de efluentes. Este tratamento pode ser físico-químico ou biológico. A escolha do processo leva em conta o tipo de efluente a tratar, sua biodegradabilidade, a presença de toxinas, e a produção de lodos, entre outros (MOTTA *et al.*, 2003, SPEECE, 1996).

Os tratamentos físico-químicos permitem a remoção parcial da matéria orgânica. Esta remoção ocorre pela precipitação de proteínas e gorduras pelo uso de substâncias químicas (RUSTEN *et al.*, 1993). Este tipo de processo apresenta como desvantagem, além da utilização de produtos químicos, o elevado custo e a remoção ineficiente de DQO. Assim, o tratamento biológico surge como uma alternativa na maioria dos casos (VIDAL *et al.*, 2000)

Quando comparados aos processos físico-químicos, os processos biológicos apresentam como vantagens o menor custo; a possibilidade da conversão da matéria orgânica em dióxido de carbono e água; e a presença de agentes do processo (os micro-organismos) auto replicantes, onde uma vez estabelecidas as condições adequadas para a sobrevivência da biomassa, esta se mantém ativa por longo tempo (PAYNE, 1997).

Para a escolha do tratamento a ser utilizado, deve-se levar em consideração não só o efluente a ser tratado, mas também: custo, tanto operacional como de implantação; sustentabilidade do sistema; simplicidade operacional, de controle e de manutenção; eficiência de remoção dos poluentes; pouco ou nenhum problema de disposição do lodo gerado na estação; baixos requisitos de área; flexibilidade em relação às expansões futuras; ausência de problemas à população vizinha; possibilidade de recuperação de subprodutos úteis e existência de experiência prática (CHERNICHARO, 1997).

## **2.6. Sistema de Tratamento Anaeróbio**

Os processos biológicos podem ser divididos em aeróbios e anaeróbios. O tratamento anaeróbio de efluentes consiste na utilização da matéria orgânica por micro-organismos na ausência de oxigênio livre. É um processo fermentativo caracterizado pela produção principalmente de metano e dióxido de carbono (STRONACH *et al.*, 1986, STARKENBURG, 1997).

Atualmente, é crescente a busca por fontes alternativas de energia. Deste modo os processos anaeróbios tornam-se vantajosos uma vez que permitem a produção de energia através do metano.

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

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).

Os micro-organismos que participam desta etapa de digestão podem ser divididos em três grupos:

- Bactérias fermentativas, que, por hidrólise, transformam macromoléculas em monômeros, e estes em acetato, hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos orgânicos de cadeia curta;
- Bactérias acetogênicas, que são produtoras de hidrogênio, convertendo os produtos gerados pelas bactérias fermentativas em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono;
- Arqueas metanogênicas, que utilizam como substrato os produtos finais gerados pelas bactérias acetogênicas. Uma parte das arqueas metanogênicas utiliza o acetato, transformando-o em metano, dióxido de carbono e água, enquanto o restante produz metano através da redução do dióxido de carbono.

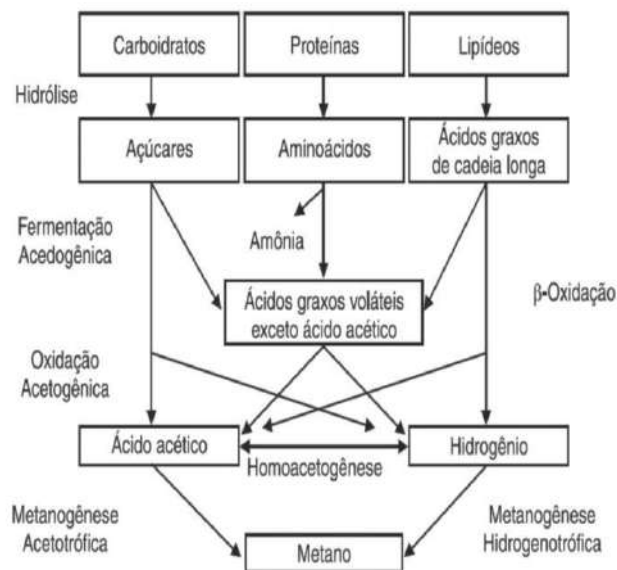
O processo de digestão anaeróbia pode ser dividido em quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

- Hidrólise: o material orgânico particulado é hidrolisado pela ação de enzimas extracelulares 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 (LETTINGA *et al.*, 1996): temperatura de operação do biorreator, composição do substrato, pH do meio, tamanho das partículas, entre outros.



- Acidogênese: as bactérias fermentativas acidogênicas absorvem os compostos solúveis gerados na hidrólise, convertendo-os em ácidos orgânicos voláteis (principalmente ácido acético, butírico e propiônico).
- Acetogênese: nesta etapa ocorre a conversão dos produtos da acidogênese em compostos que constituem os substratos para formação de metano: acetato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>.
- Metanogênese: as arqueas metanogênicas utilizam o acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, transformando-os em metano, CO<sub>2</sub> e água. Esta é a etapa final do processo de degradação anaeróbia.

A Figura 2.5 apresenta as etapas de degradação anaeróbia de substâncias orgânicas.



**Figura 2.5:** Etapas de degradação anaeróbia dos componentes orgânicos presentes nos efluentes (MENDES *et al.*, 2005).

A digestão anaeróbia requer controle das condições ambientais, pois o processo requer interação das bactérias fermentativas e metanogênicas. Os principais fatores ambientais que influenciam este processo são: carga orgânica; temperatura;

pH, ácidos orgânicos e alcalinidade; nutrientes e compostos tóxicos; concentração e tipo do efluente; tempo de residência do lodo e a biodisponibilidade de nutrientes.

## **2.7. Enzimas no Tratamento de Efluentes**

Atualmente, vem crescendo o interesse pela solução de problemas que envolvem o meio ambiente. Com o objetivo de melhorar as condições de vida da sociedade, muitas pesquisas vêm sendo realizadas a fim de evitar a disposição inadequada de resíduos sólidos e águas residuárias sem nenhum tratamento ou com tratamento inadequado nos corpos receptores (BLUNDI E UTIDA, 1997).

As enzimas podem ser aplicadas no tratamento de diversos tipos de efluentes como, efluentes com contaminantes fenólicos, pesticidas, surfatantes, metais pesados ou cianetos, resíduos da indústria de celulose e papel, resíduos da indústria alimentícia, assim como na desidratação de lodos, na bioconversão de cascas de crustáceos e na degradação de pectina (KARAM E NICELL, 1997; JORDAN E MULLEN, 2007).

Tradicionalmente o tratamento de resíduos se dá através de populações microbianas. Porém, a maioria dos efluentes industriais está sujeita a grandes variações, que podem afetar o tratamento biológico. Alterações de pH, temperatura, composição química e aumento na concentração de poluentes podem ser inibitórios para o crescimento microbiano.

O tratamento de despejos industriais através de enzimas tem despertado grande interesse em muitos grupos de pesquisa, pois as enzimas são biocatalisadores altamente seletivos com diversas vantagens, dentre elas:

- Facilidade no controle do processo;
- Facilidade no manuseio e estoque;
- Não requerimento de aclimatação da biomassa;
- Especificidade;
- Aplicação em processos com baixa ou alta concentração de poluentes;
- Operação em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade;

- Efeitos por choque de carga menos significativos;
- Volume de lodo inexistente, uma vez que não há formação de biomassa (KARAM E NICELL, 1997).

Dentre os processos de tratamento de efluentes, as enzimas se aplicam na remoção de compostos específicos de misturas complexas antes do tratamento biológico; no polimento de águas residuárias tratadas ou de águas subterrâneas para enquadramento nos limites de toxicidade; na remoção de compostos específicos em misturas diluídas para as quais os tratamentos biológicos não podem ser aplicados; no tratamento de resíduos gerados ocasionalmente ou em locais isolados; no tratamento “in-plant” de águas residuárias com alta concentração de poluentes e baixos volumes no seu ponto de geração (AITKEN, 1993).

Porém, a utilização de enzimas apresenta algumas desvantagens como: instabilidade térmica, susceptibilidade ao ataque por proteases, inibição da atividade e impossibilidade de separação e reutilização do catalisador livre ao final da reação (CRECCHIO *et al.*, 1995).

Para o tratamento de efluentes, a utilização de enzimas não pode significar uma elevação significativa dos custos do processo. Assim, a utilização de preparados comerciais torna-se economicamente inviável, devido a seu elevado custo. Dessa forma, cresce a busca de alternativas técnicas e economicamente viáveis para a produção de enzimas, como por exemplo, a produção através do processo de fermentação em estado sólido (CASTILHO *et al.*, 2000b).

Alguns critérios devem ser levados em consideração na utilização de um tratamento enzimático antes de sua aplicação, tais como: a toxicidade dos produtos da reação, que devem ser mais biodegradáveis que os compostos originais ou mais facilmente removidos nos tratamentos subsequentes; a enzima deve ser capaz de catalisar seletivamente a degradação do composto alvo no efluente real; a enzima deve ser ativa e estável nas condições típicas de tratamento, considerando que podem ocorrer variações na composição química do efluente, assim como o pH e temperatura, que podem não estar nos valores ótimos de atuação e/ou estabilidade da enzima; os biorreatores para os processos enzimáticos devem ser simples e as

enzimas facilmente obtidas, com baixos custos e sem necessidade de cofatores caros (AITKEN *et al.*, 1994).

## **2.8. Tratamento Enzimático de Efluentes com alto teor de óleos e graxas (O&G)**

Efluentes de indústrias alimentícias são ricos em moléculas orgânicas que são lentamente biodegradadas, ou seja, gorduras e proteínas. Altos teores de lipídios nos efluentes podem causar grande impacto ambiental, pois estes criam filmes na superfície da água, o que impede a transferência de oxigênio do ar atmosférico para a água, causando a morte de muitos organismos aquáticos (CAMMAROTA E FREIRE, 2006).

Os tratamentos biológicos aeróbios podem apresentar alguns problemas operacionais em decorrência da presença de óleos e graxas nos efluentes, como a desfloculação, o crescimento excessivo de micro-organismos filamentosos e a má sedimentação do lodo, entre outros. Estes problemas resultam em uma queda da qualidade do lodo e uma progressiva perda de eficiência de remoção da matéria orgânica, gerando um efluente tratado de má qualidade.

Já nos processos biológicos anaeróbios, alguns problemas são encontrados durante o tratamento de efluentes com altos teores de gordura, tais como o desenvolvimento de lodos com baixa atividade, com inadequadas características físicas e com elevada tendência de flotação; produção de espuma; colmatação do lodo e arraste da biomassa, levando à perda de eficiência e até mesmo ao colapso do reator. Além disso, ocorre adsorção de gorduras na superfície do lodo, dificultando o transporte de substratos solúveis para a biomassa e levando à queda da taxa de conversão desses substratos (PETRUY E LETTINGA, 1997). Desta forma, torna-se necessário uma hidrólise prévia da gordura presente no efluente de forma a evitar problemas operacionais nos reatores, tanto aeróbios quanto anaeróbios, durante o tratamento do efluente.

A aplicação específica de lipases ou de “pools” enzimáticos com elevadas atividades lipásicas no tratamento de efluentes é um campo relativamente pouco estudado, porém tem se mostrado bastante promissor. As lipases podem ser

empregadas no tratamento de efluentes com alto teor de gorduras como os gerados nas indústrias de laticínios, frigoríficos, abatedouro de aves e pescados (LEAL *et al.*, 2006; VALLADÃO *et al.*, 2007; VALENTE, 2009).

Valladão *et al.* (2007) estudaram a aplicação de lipase durante a etapa de pré-hidrólise enzimática no tratamento anaeróbio de efluente de abatedouro de aves contendo elevados teores de gordura. A lipase utilizada neste estudo foi aplicada na forma de um preparado enzimático sólido (PES) em diferentes concentrações. O PES foi obtido por meio de fermentação em meio sólido utilizando como meio basal a torta de babaçu, um rejeito agroindustrial. Foram realizados testes para avaliação da hidrólise do efluente contendo teores de O&G que variavam entre 150 e 1200 mg/L por concentrações de PES de 0,1; 0,5 e 1,0% (m/v). A eficiência da pré-hidrólise enzimática no tratamento biológico foi verificada por meio do acompanhamento do decaimento da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e da produção de biogás. Bons resultados foram obtidos em termos de redução de DQO e biogás, mesmo quando empregadas reduzidas concentrações de PES (0,1% m/v) e efluente contendo o maior teor de O&G testado (1200 mg/L).

Rosa *et al.* (2006) estudaram a utilização do mesmo PES de *P. restrictrum* (com 0,1% (m/v), 24 h a 30°C) no pré-tratamento de efluentes de laticínio em sistemas de lodo ativado operando continuamente. Os dois sistemas (tratado com PES e o controle- sem enzima), apresentaram remoção de DQO semelhantes (80 a 90%), porém o acúmulo de gordura nos flocos do biorreator controle foi maior (1,7 vezes) do que nos flocos do biorreator alimentado com efluente previamente hidrolisado. Este último, por sua vez, apresentou matéria orgânica menos complexa, que teve sua assimilação pelos micro-organismos facilitada, justificando os maiores valores de taxa consumo de oxigênio quando comparado reator controle.

Valente *et al.* (2008) estudaram a utilização de PES obtido por fermentação em estado sólido com o fungo *Penicillium simplicissimum* e como meio basal a torta de babaçu. Foram avaliadas diferentes concentrações de PES (0,2, 0,5 e 1,0% m/v) no tratamento anaeróbio de efluentes de indústria de pescado contendo 1500 mg O&G/L. O pré-tratamento enzimático do efluente utilizando 0,5% de PES resultou em uma produção específica de metano 2,7 vezes maior do que em experimento controle (sem adição de PES), indicando que a utilização deste processo de tratamento permite uma

maior facilidade na assimilação da matéria orgânica pelos micro-organismos anaeróbios.

A utilização de um preparado enzimático líquido (PEL) no pré-tratamento de um efluente de laticínio foi estudado por Leal (2000), que utilizando 10% (v/v) conseguiu obter resultados promissores no tratamento de efluente de laticínios com teores de gordura de até 1200 mg/L. As eficiências de remoção de DQO obtidas em um biorreator anaeróbio operado em batelada e alimentado com o efluente sem tratamento enzimático foram da ordem de 20 a 70% após 96 h, enquanto o reator alimentado com o efluente pré-tratado enzimaticamente apresentou uma eficiência de remoção na ordem de 80 a 95% no mesmo período.

## **2.9. Utilização de Biossurfatantes no Tratamento de Efluentes**

Atualmente é crescente a preocupação com o meio ambiente. A poluição causada por petróleo e seus derivados é um dos problemas mais prevalentes no ambiente. O lançamento do petróleo no ambiente por derramamento vem recebendo grande atenção. Estes acidentes causam poluição do solo e das águas superficiais e subterrâneas e, por essa razão, muitas técnicas estão sendo desenvolvidas para limpar solos e as águas contaminados por petróleo. Os tratamentos biológicos são mais eficientes e mais baratos do que os tratamentos físico-químicos. Assim, a tecnologia de biorremediação está sendo utilizada para a degradação do óleo cru no solo através da ação de micro-organismos capazes de transformar petróleo em compostos menos tóxicos. Porém, a baixa solubilidade e a presença de hidrocarbonetos de alta massa molecular são dois grandes limitantes para este tratamento. Neste caso, a adição de biossurfatante aumenta a solubilidade e remoção desses contaminantes, melhorando as taxas biodegradação do óleo (MILLIOLI *et al.*, 2009).

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

formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfatantes. Estas propriedades tornam os surfatantes adequados para um grande número de aplicações industriais, dentre elas destacando-se: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (SINGH *et al.*, 2007).

Os surfatantes podem ser sintetizados pelo homem a partir de derivados do petróleo ou por organismos vivos a partir de diversas fontes de carbono. Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfatantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfatantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (BANAT *et al.*, 2000). O biossurfatante utilizado no presente trabalho é um ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa*, um biossurfatante da classe dos glicolipídios (NITSCHKE E PASTORE, 2002).

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

Zhang *et al.* (2009) estudaram a adição de solução aquosa de ramnolipídio na forma de um caldo de cultura livre de células de *Pseudomonas aeruginosa* em sistemas de lodos ativados para o tratamento aeróbio de óleo de fritura residual. Foi analisada a eficiência da remoção de óleo de fritura determinada pela concentração de O&G e DQO. As concentrações de ramnolipídio variaram de 22,5 a 90 mg/L, sendo o tempo de retenção hidráulica de 30 h, na escala de bancada, suficiente para remover mais de 93% de O&G, enquanto que no sistema controle (sem adição de biossurfatante) a redução máxima foi de 10%. Já na escala piloto, a maior eficiência do tratamento com a adição do biossurfatante foi de aproximadamente 95%, com tempo de retenção hidráulica de 12 h, enquanto o tratamento controle alcançou uma eficiência de 17%. Os autores concluíram que a adição do caldo de cultura contendo ramnolipídio, mostrou grande potencial para o tratamento de águas residuárias oleosas por lodos ativados.

Nakhla *et al.* (2003) estudaram o efeito da adição de um biossurfatante no tratamento anaeróbio de efluente com elevado teor de O&G, gerado em uma indústria de ração animal. Os testes foram realizados adicionando o biossurfatante no efluente bruto e no efluente após a etapa de flotação. Como resultado, os autores afirmam que a adição do biossurfatante ao efluente bruto reduziu a DQO total em 63%, contra 34% do controle, e a DQO solúvel em 73%, contra 37% do controle, indicando o efeito positivo do biossurfatante como auxiliar na redução da DQO. Já no efluente pré-tratado por flotação, a adição do biossurfatante não apresentou diferença significativa, sendo a redução da DQO total de 44, 48 e 48% para as adições de 250 mg/L, 100 mg/L e 0 mg/L, respectivamente; e a redução da DQO solúvel de 84, 85 e 85% respectivamente.

Santa Anna *et al.* (2007) estudaram o efeito da aplicação de biossurfatante do tipo ramnolipídio, livre de células, em solo arenoso contaminado com óleo petróleo, predominantemente hidrocarbonetos aromáticos ou parafínicos. Foi observada remoção de 91 e 78%, respectivamente, utilizando concentrações entre 6,3-7,9 g/L, sendo este biossurfatante capaz de reduzir a concentração de óleo em contaminação de solo arenoso.

O Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) da UFRJ em convênio com o CENPES/Petrobrás vem desenvolvendo, desde 2000, diversos trabalhos de produção de ramnolipídios utilizando uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* PA1, isolada de poços de petróleo e oriunda da coleção de culturas do CENPES/Petrobrás. A otimização do meio de cultivo, a busca de fontes de carbono de baixo custo e nas modificações no modo de condução do processo fermentativo levaram à minimização (900%) da produção de fatores de virulência de natureza protéica, com concomitante aumento da produção de ramnolipídio (SANTOS *et al.*, 2002; SANTA ANNA *et al.*, 2002, 2007).



### 3. Justificativa e Objetivos

As enzimas de interesse industrial têm sido produzidas tradicionalmente por fermentação submersa (FS). No entanto, a FES é uma alternativa interessante à FS. O grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) vem trabalhando com o fungo *Penicillium simplicissimum*, selecionado como produtor de lipase por FES utilizando o rejeito da produção de óleo de babaçu, a torta de babaçu, como meio de cultivo. A otimização da composição do meio e das condições de cultivo foi realizada tendo a torta de babaçu como meio basal. Este fungo mesofílico produz uma lipase ácida e termoestável de elevado potencial biotecnológico.

Devido às características da FES, a recuperação de enzimas extracelulares das partículas sólidas torna-se uma etapa importante no aumento da eficiência de todo o processo. A recuperação destas enzimas ocorre através da adição de um solvente líquido aos sólidos fermentados. Esta etapa de extração possui muitos parâmetros que podem afetar a quantidade de produto obtido (unidades de atividade lipásica).

A utilização de enzimas no tratamento de efluentes tem sido uma alternativa ao tratamento convencional e tem despertado o interesse de vários grupos de pesquisa, como o de Tecnologia Ambiental (EQ-UFRJ). O emprego de sistemas de pré-tratamento com a finalidade de hidrolisar e dissolver as gorduras pode melhorar a degradação biológica de efluentes com altos teores de gordura, acelerando o processo e reduzindo o tempo de tratamento.

Na área ambiental, muitos estudos relatam o uso de biossurfatantes para aumentar a interação água/óleo, acelerar a degradação de vários óleos por microorganismos e promover a biorremediação de águas e solos (MILLIOLI *et al*, 2009). Assim, a utilização de enzimas combinada com a aplicação de biossurfatantes torna-se uma alternativa interessante para aumentar a eficiência do tratamento de efluentes com elevados teores de gordura.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho é a otimização da etapa de extração das lipases extracelulares de *P. simplicissimum* produzidas por FES em torta de babaçu utilizando técnicas de planejamento estatístico de experimentos e posterior aplicação desta enzima e do ramnolipídio de *P. aeruginosa* na hidrólise enzimática de

efluente proveniente da indústria de abate de aves e estudo do efeito da etapa de pré-hidrólise no tratamento anaeróbio deste efluente.

Objetivos Específicos:

- Seleção dos parâmetros que influenciam estatisticamente no processo de extração das lipases utilizando técnicas de planejamento de experimentos do tipo Plackett & Burman ou fracionado.
- Otimização do processo de extração de lipases utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR), identificando as condições de extração para obtenção de maior atividade e estabilidade lipásica.
- Aplicação do extrato enzimático obtido nas condições ótimas de extração na hidrólise de efluente proveniente da indústria de abate de aves: otimização da etapa de hidrólise do efluente utilizando planejamento fatorial completo tendo como variáveis a temperatura, concentração do extrato enzimático e a concentração do biossurfatante do tipo ramnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.
- Avaliação da produção específica de metano no processo de digestão anaeróbia do efluente pré-tratado (com enzima e biossurfatante) e bruto (não hidrolisado).

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1. Micro-organismo**

Foi utilizado o fungo *Penicillium simplicissimum*, selecionado como um bom produtor de lipase por FES (GUTARRA *et al.*, 2005). Para a obtenção dos esporos, o fungo foi propagado em estufa por 7 dias a 30 °C, em meio contendo (% m/v): 0,5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,0 amido solúvel; 0,025 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,05 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 CaCO<sub>3</sub>; 0,1 extrato de levedura; 1,0 óleo de oliva; e 2,0 ágar. Os esporos foram raspados com auxílio de uma alça e recuperados em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0) formando uma suspensão. A concentração dos esporos foi determinada através de contagem em microscópio óptico usando uma câmara de Neubauer.

### **4.2. Fermentação em estado sólido**

Um resíduo sólido proveniente da extração do óleo de babaçu, denominado torta de babaçu, foi utilizado como meio de cultura. Os sólidos foram suplementados com 6,25% (m/m) de melão e umedecidos a 65% (m/m). A torta foi triturada obtendo-se partículas com diâmetros de até 3 mm. Foram utilizados reatores do tipo bandeja com 15 g de torta, sendo esta inoculada com 10<sup>7</sup> esporos/g e incubada em uma câmara com temperatura e umidade controladas a 30°C e 95%, respectivamente, durante 96h. Após verificação do tempo ótimo de fermentação para produção de lipase, a fermentação passou a ser conduzida até 48 h.

### **4.3. Extração enzimática**

#### **4.3.1. Determinação do perfil de extração de lipase**

A enzima foi extraída utilizando-se uma condição padrão (5 mL/g de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), agitação a 200 rpm a 35°C) durante os tempos de 0,

10, 20, 30, 40 e 60 minutos. Em seguida, a torta foi prensada para se obter o extrato enzimático bruto, que foi centrifugado a 3000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade lipásica.

#### 4.3.2. Seleção da solução de extração

Foram adicionados 5 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) por grama de torta de babaçu (condição padrão), seguido de agitação a 200 rpm a 35 °C por 40 minutos para garantir total extração da lipase. Tampão fosfato de sódio contendo NaCl (0,6% m/v), Tween 80 (0,1% m/v), Triton X-100 (0,5% m/v) ou glicerol (20% m/v) também foram utilizados como solução de extração. A determinação da atividade lipásica foi realizada com o sobrenadante fresco e estocado por 15 e 30 dias a -20°C.

#### 4.3.3. Determinação das condições de extração da lipase

A seleção de fatores importantes para extração da lipase foi realizada utilizando a técnica de planejamento experimental do tipo Plackett & Burman. Os fatores estudados foram agitação, volume da solução de extração, temperatura, molaridade do tampão, concentração de NaCl e concentração de Tween 80, conforme a Tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Variáveis e seus respectivos níveis

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
<i>Agitação (rpm)</i>	100	200	300
<i>Volume (mL)</i>	5	7	9
<i>Temperatura (°C)</i>	25	35	45
<i>pH</i>	5	6	7
<i>Molaridade</i>	0,01	0,045	0,1
<i>Conc. NaCl (% m/v)</i>	0	0,1	0,2
<i>Conc. Tween 80 (% m/v)</i>	0	0,1	0,2

Posteriormente, um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) foi realizado de forma a otimizar as condições de extração em função dos parâmetros significativos identificados no planejamento do tipo PB. Os fatores estudados foram

volume de solução de extração, temperatura, pH e concentração de Tween 80, mantendo-se constantes a molaridade do tampão a 0,1M, a agitação a 200 rpm e sem adição de NaCl, conforme a Tabela 4.2.

Para todos estes experimentos a extração foi realizada por 40 minutos de forma a garantir total extração da lipase. A determinação da atividade lipásica foi realizada com o sobrenadante fresco e estocado por 45 dias a -20°C.

**Tabela 4.2:** Variáveis e seus respectivos níveis.

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	1	2
Temperatura (°C)	25,0	27,5	30	32,5	35
pH	6,0	6,5	7	7,5	8
Volume (mL)	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
Con. Tween (% m/v)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

#### 4.4. Determinação da atividade lipásica

##### 4.4.1. Método espectrofotométrico

A determinação da atividade lipásica pelo método espectrofotométrico baseia-se na formação de um produto cromóforo (*p*-nitrofenol) a partir da reação de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato catalisada por lipases. A solução do substrato foi preparada utilizando-se 0,25 mL de *p*-nitrofenil laurato 2,5 mM em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato enzimático e conduzida a 30°C. A formação do *p*-nitrofenol foi acompanhada ao longo do tempo em espectrofotômetro 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/g de massa seca inicial. O cálculo da atividade enzimática foi feito pela Equação 4.1:

$$A_L = \frac{(\alpha \cdot F \cdot V_f)}{V_a} \cdot F_d \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde:

$A_L$  = Atividade lipásica (U/mL)

$\alpha$  = coeficiente angular da reta (Abs x tempo)

F = fator (Abs x concentração de produto)

$V_f$  = volume final (mL)

$V_a$  = volume de amostra (mL)

$F_d$  = fator de diluição

O cálculo da atividade enzimática em U/g foi feito pela Equação 4.2:

$$A_L(U/g) = \frac{V}{M} \cdot A_L(U/mL) \quad (\text{Equação 4.2})$$

Onde,

$A_L$  = Atividade lipásica

V = Volume utilizado para extração (mL)

M = Massa seca inicial (g)

#### 4.4.2. Método titulométrico

A determinação da atividade lipásica pelo método titulométrico utiliza como substrato o óleo de oliva (5% m/v) emulsionado por 3 minutos com goma arábica (5% m/v) em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0). O extrato enzimático (1 mL) foi

adicionado a 19 mL de emulsão e incubado por 20 minutos a 35°C (em pH 7,0) em banho com agitação a 200 rpm. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de acetona-etanol (1:1 v/v), que também promove a extração dos ácidos graxos liberados. Os ácidos graxos foram titulados com solução 0,04 mol/L de NaOH em titulador automático até um valor de pH final de 11,0. Os brancos reacionais foram obtidos adicionando-se o preparado enzimático após a solução de acetona-etanol. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio (FREIRE *et al.*, 1997a e b), de modo que o cálculo da atividade enzimática foi feito pela Equação 4.3:

$$A_L = \frac{(V - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot V_a} \quad (\text{Equação 4.3})$$

Onde:

$A_L$  = Atividade lipásica (U/mL)

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

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

$M$  = molaridade da solução de NaOH (mmols/mL)

$t$  = tempo de reação (min)

$V_a$  = volume de amostra (mL)

O cálculo da atividade enzimática em U/g foi feito pela Equação 4.4:

$$A_L(U/g) = \frac{V}{M} \cdot A_L(U/mL) \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde,

$A_L$  = Atividade lipásica

$V$  = Volume de extração utilizado para extração (mL)

$M$  = Massa seca inicial (g)

#### 4.5. Coleta e Caracterização do efluente e lodo

O efluente utilizado neste trabalho é proveniente de uma indústria de abate de aves situada no Rio de Janeiro, tendo sido coletado antes da etapa de flotação e caracterizado em termos de pH, DQO, sólidos suspensos (totais, fixos e voláteis), nitrogênio total, fósforo total e óleos e graxas. O lodo anaeróbio foi coletado do reator UASB (“*upflow anaerobic sludge blanket*”) em operação na indústria de abate de aves e foi caracterizado em termos de concentração de sólidos totais, fixos e voláteis e concentração de gordura acumulada (APHA, 2005). Ambos foram mantidos sob refrigeração a aproximadamente 4°C.

#### 4.6. Hidrólise enzimática de efluente da indústria de abate de aves.

O Preparado Enzimático Líquido (PEL) obtido por fermentação em estado sólido do fungo *P. simplicissimum* foi extraído utilizando as condições otimizadas (3 mL de tampão por grama de massa seca, 25°C e 0,5% (m/v) de Tween 80) e, posteriormente, utilizado no processo de hidrólise do efluente da indústria de abate de aves. Primeiramente foi realizado um ensaio a fim de determinar o tempo de hidrólise, analisando os tempos de 4, 8 e 24 horas. Posteriormente foram definidas as condições de hidrólise por um planejamento do tipo fatorial, tendo como variáveis a temperatura, o volume de PEL e a concentração de biossurfatante (ramnolipideo de *Pseudomonas aeruginosa*, 4,9g/L – Damasceno, 2010), conforme a Tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Variáveis e seus respectivos níveis.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
T (°C)	34	40	46
Biossurfatante (% v/v)	0,10	0,25	0,40
PEL (mL/100mL de efluente)	3,8	5	6,2



A hidrólise foi realizada em reatores encamisados, conectados a um banho, contendo 100 ml de efluente, agitados a 400 rpm, durante 8 horas.

Os experimentos foram conduzidos utilizando 0,1 g/L de azida, a fim de inibir a atividade microbiana e o consumo dos ácidos livres produzidos durante a hidrólise.

#### 4.6.1. Ácidos Livres

O monitoramento da 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 até “*end-point*” 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 PEL.

O teor de ácidos livres foi calculado pela equação 4.5.

$$AL = \frac{V.N.1000}{V_{am}} \quad (\text{Equação 4.5})$$

Sendo:

$AL$  = teor de ácidos livres ( $\mu\text{moles/mL}$ )

$V$  = volume de NaOH titulado (mL)

$N$  = normalidade da solução de NaOH

$V_{am}$  = volume de amostra (mL)

#### 4.7. Ensaios de biodegradabilidade anaeróbia

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foram realizados tanto com os efluentes pré-tratados enzimaticamente, quanto com os efluentes brutos, ou seja, sem adição de PEL. Cada ensaio foi conduzido em 6 frascos tipo penicilina de 100 mL com

90% do volume útil composto de lodo anaeróbio coletado em reator UASB de indústria de abate de aves e efluente bruto ou pré-tratado. A quantidade de lodo utilizada em cada ensaio foi calculada para se manter uma relação DQO (inicial do efluente): SSV (lodo) de 1:1. Os frascos foram incubados a 30°C por até 8 dias. O lodo utilizado no presente trabalho foi caracterizado por Damasceno (2010) apresentando concentração de 14895 mg de sólidos voláteis/L. 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 (8º dia), após o recolhimento do biogás para análise em cromatógrafo gasoso e abertura dos frascos tipo penicilina. As quantidades dos nutrientes nitrogênio e fósforo nos efluentes de todas as coletas foram suficientes para suprir as necessidades nutricionais dos micro-organismos, não havendo necessidade de suplementação dos mesmos.

#### 4.7.1. pH

O pH das amostras do efluente foi medido por leitura direta em potenciômetro.

#### 4.7.2. Demanda Química de Oxigênio

Na determinação da DQO foi empregado o método colorimétrico padrão de refluxo fechado (Hach), com  $K_2Cr_2O_7$  em meio ácido, contendo  $Ag_2SO_4$  como catalisador e  $HgSO_4$  para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra. As amostras foram diluídas (quando necessário) de forma adequada para as faixas de DQO contempladas pelo método. Logo em seguida foram adicionadas as soluções para o ensaio, sendo os tubos colocados no digestor Hach a 150°C durante 2 horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi realizada a leitura direta da absorvância em espectrofotômetro. Os brancos foram preparados com água destilada substituindo as amostras. Os valores de absorvância a 600 nm foram convertidos em DQO através de uma curva padrão previamente preparada utilizando-se biftalato de potássio como substância padrão (APHA, 2005).

#### 4.7.3. Volume e Composição do Biogás

O volume do biogás produzido nos testes conduzidos em frascos tipo penicilina de 100 mL, com 10 % de “*headspace*”, foi medido pelo deslocamento do embôlo de seringas de 20 mL, conectadas aos frascos testes. O biogás produzido foi recolhido em ampolas gasométricas e injetado diretamente no cromatógrafo VARIAN MICRO GC 4900. 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

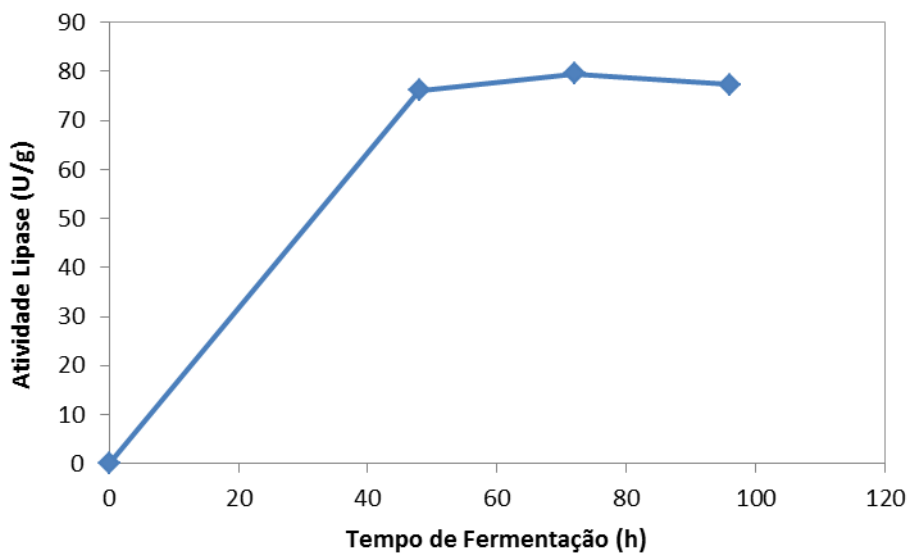
Gás de arraste – Hélio

Tempo de análise – 1,5 minutos

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Perfil de produção de lipase

A produção de lipase do fungo *Penicillium simplicissimum* foi realizada por fermentação no estado sólido utilizando a torta de babaçu como meio de cultivo. Para a determinação do tempo ótimo de fermentação foi realizada uma análise do perfil de produção de lipase com o tempo. Foram analisados os tempos de 48, 72 e 96 horas de fermentação, conforme indica a Figura 5.1. O tempo de 24 horas de fermentação da torta de babaçu utilizando o fungo *P. simplicissimum* foi estudada anteriormente e não apresentou valor significativo de atividade lipásica (Gutarra, 2007).



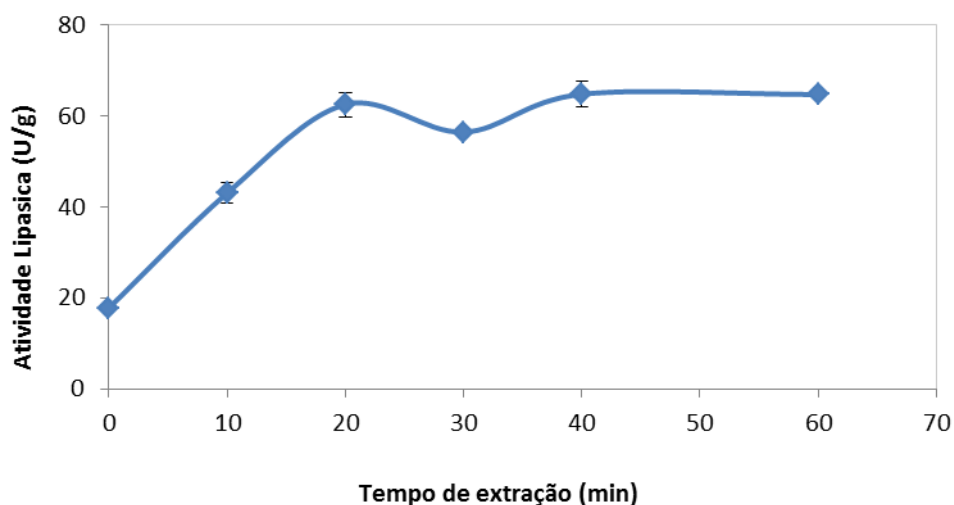
**Figura 5.1:** Perfil de produção de lipase com o tempo. Análise da atividade enzimática pelo método espectrofotométrico utilizando como substrato p-nitrofenil laurato.

Observa-se na Figura 5.1 que a produção de lipase não se altera de maneira significativa no período entre 48 e 96 horas de fermentação. Utilizando o método titulométrico para determinação da atividade lipásica, para o tempo de 48 horas de fermentação foi possível obter um extrato enzimático contendo 4,1 U/g. Este método

permite avaliar a atividade enzimática através da utilização do óleo de oliva, um triglicerídeo, a 35°C e pH 7,0. Desta forma a atividade lipásica pode ser determinada em condições próximas às encontradas no tratamento do efluente com elevado teor de gordura.

## 5.2. Perfil de extração de lipase

Foi realizada a análise da recuperação da lipase na condição padrão (5 mL/g de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 e agitação a 200 rpm a 35°C) nos tempos de 0, 10, 20, 30, 40 e 60 minutos de extração. De acordo com a Figura 5.2, é possível observar um aumento na extração de lipase até o tempo de 20 minutos, não ocorrendo diferença significativa na recuperação da enzima após este tempo, indicando total remoção da enzima ou saturação do solvente pela enzima ou por demais compostos que possam ter sido extraídos do meio. No tempo zero pode ser obtido aproximadamente 20 U/g. Esta atividade pode ser explicada pelo fato de que parte das enzimas excretadas permanecem na fase líquida, ou seja, não estão adsorvidas na matriz sólida, o que torna mais fácil sua remoção (MITCHELL *et al.*, 2000). Sendo assim, dentro da faixa estudada, a partir de 20 minutos qualquer tempo é suficiente para extração da lipase de *P. simplicissimum*. Desta forma, foi adotado o tempo de 40 minutos para as etapas posteriores.



**Figura 5.2:** Perfil de extração de lipase utilizando tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) com agitação a 200 rpm a 35°C (Condição padrão). Atividade lipásica determinada através do método espectrofotométrico.

Aikat *et al.* (2000) estudaram o perfil de recuperação de protease produzida por fermentação em farelo de trigo utilizando água destilada como solvente e observaram que 90% da protease foi recuperada após 2 horas de extração e esta foi completa em 10 horas. Para lipase produzida por fermentação em grão de soja, quase toda extração da lipase ocorreu nos primeiros 2 minutos do processo de extração e os autores atribuíram este fato ao crescimento e secreção das enzimas pelos fungos preferencialmente na superfície de partículas sólidas (VARDANEGA *et al.*, 2008). No presente trabalho a extração ocorreu em um tempo aproximadamente 10 vezes maior do que o observado por Vardanega *et al.* (2008), provavelmente porque o fungo *P. simplicissimum* cresce não somente na superfície da torta de babaçu como também penetra nas partículas sólidas (GUTARRA *et al.*, 2009), dificultando a extração da lipase secretada no interior das partículas. Outra hipótese é que as lipases de *P. simplicissimum* ligam-se e interagem fortemente com alguns componentes da superfície da matriz e/ou com a parede do fungo. De acordo com Fernandez-Lafuente

*et al* (1998), as lipases possuem elevada afinidade por superfícies hidrofóbicas e isso faz com que o tempo de extração se prolongue.

### **5.3. Efeito da solução de extração na recuperação e na estabilidade de estocagem da enzima**

Foram testadas as seguintes soluções: tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0) e o mesmo tampão com 0,6% NaCl (m/v), 0,1% Tween 80 (m/v), 0,5% Triton X-100 (m/v) ou 20,0% glicerol (m/v). As amostras foram extraídas (condição padrão) e a atividade lipásica determinada, através do método espectrofotométrico, no extrato fresco e após estocagem a -20°C por um período de 30 dias, conforme mostra a Tabela 5.1.

A extração utilizando Tween 80, um surfatante não-iônico, apresentou excelente recuperação enzimática, obtendo o maior valor de atividade, quando comparado com os demais solventes (85,7 U/g). No final da fermentação, o lipídio residual e a hidrofobina presente na parede do fungo podem ocasionar a adsorção das lipases produzidas (PALOMO *et al.*, 2003). Desta forma, é possível que a parte hidrofóbica do Tween 80 atraia a lipase promovendo a dessorção desta do meio sólido fermentado, melhorando a extração. O Tween também mostrou bons resultados na extração de outras proteínas, provavelmente devido à propriedade de envolver proteínas através de formação de micelas (DÍAZ *et al.*, 2007). Díaz *et al.* (2007) também observou semelhante efeito do surfatante para recuperação de xilanase e exo-poligalacturonase produzida por fermentação em bagaço de uva. Conforme a Tabela 5.1, a enzima extraída com Tween 80 manteve-se estável por 15 dias estocada a -20°C, apresentando perda de atividade de aproximadamente 30% após 30 dias.

A enzima extraída com Triton X-100 apresentou o valor mais baixo de atividade enzimática. Apesar de ser um surfatante, facilitando a extração da enzima do meio sólido, o Triton X-100 pode apresentar efeito inibitório para as lipases. Ibrik *et al.* (2008) observaram completa inibição da lipase produzida por *Penicillium cyclospium*

quando este surfatante é adicionado ao meio. Tal efeito também foi observado por Bancarz *et al.* (2005) para lipase produzida *Penicillium chrysogenum*. Outro fato relevante é a alta viscosidade do Triton X-100 (240 cP a 25°C), o que interfere na transferência de massa, devendo ser utilizado a temperaturas mais elevadas. O fato de a extração ocorrer a 35°C pode explicar a baixa eficiência na recuperação da enzima.

A estabilidade da lipase extraída e armazenada a -20°C apresentou comportamento semelhante quando utilizado tampão fosfato de sódio, Tween 80, Triton X-100 e glicerol. Porém, a enzima extraída com NaCl apresentou um fenômeno de hiperativação, com um aumento de cerca de 41% em sua atividade enzimática em um período de 15 dias, não apresentando perda de atividade após 30 dias de estoque. Acredita-se que a aplicação do sal na solução de extração tenha causado uma mudança conformacional na enzima de forma a promover um aumento significativo da atividade lipásica durante o período de estocagem.

O glicerol, apesar de ser reconhecido devido ao seu efeito protetor durante o armazenamento de proteínas (GEKKOT *et al.*, 2000) não foi capaz de estabilizar a lipase de *P. simplicissimum*, na concentração utilizada, durante o período de armazenamento, apresentando comportamento semelhante aos demais solventes, excluindo o tampão contendo NaCl (Tabela 5.1). Além disso, a adição de glicerol não promoveu um aumento na extração quando comparado com o tampão como solvente. Assim como o Triton X-100, a alta viscosidade do glicerol pode explicar sua baixa eficiência durante a recuperação da lipase, como evidenciado por Castilho *et al.* (2000), durante a extração de pectinases. Heck *et al.* (2005) também observaram baixa eficiência durante a recuperação de xilanase utilizando glicerol como solução de extração.



**Tabela 5.1:** Atividade do extrato bruto após extração com diferentes solventes e atividade (%) após estocagem do extrato à temperatura de -20°C. Os valores de atividade lipásica obtidos logo após a extração foram considerados como 100%.

Solvente	Atividade do extrato bruto (U/g)	Atividade residual (%)	
		15 dias	30 dias
Tampão fosfato (100 mM, pH 7,0)	64,66	105,67	69,04
Tampão + Tween 80 (1%)	85,68	100,97	69,17
Tampão + Triton X-100 (0,5%)	47,95	101,71	64,71
Tampão + Glicerol (20%)	63,36	91,91	65,60
Tampão + NaCl (0,6%)	50,69	141,40	100,14

Desta forma, as soluções contendo Tween 80 e NaCl foram selecionadas para as etapas posteriores devido a alta eficiência na extração e estabilidade da lipase de *P. simplicissimum*, respectivamente.

#### 5.4. Otimização da extração de lipase utilizando planejamento experimental

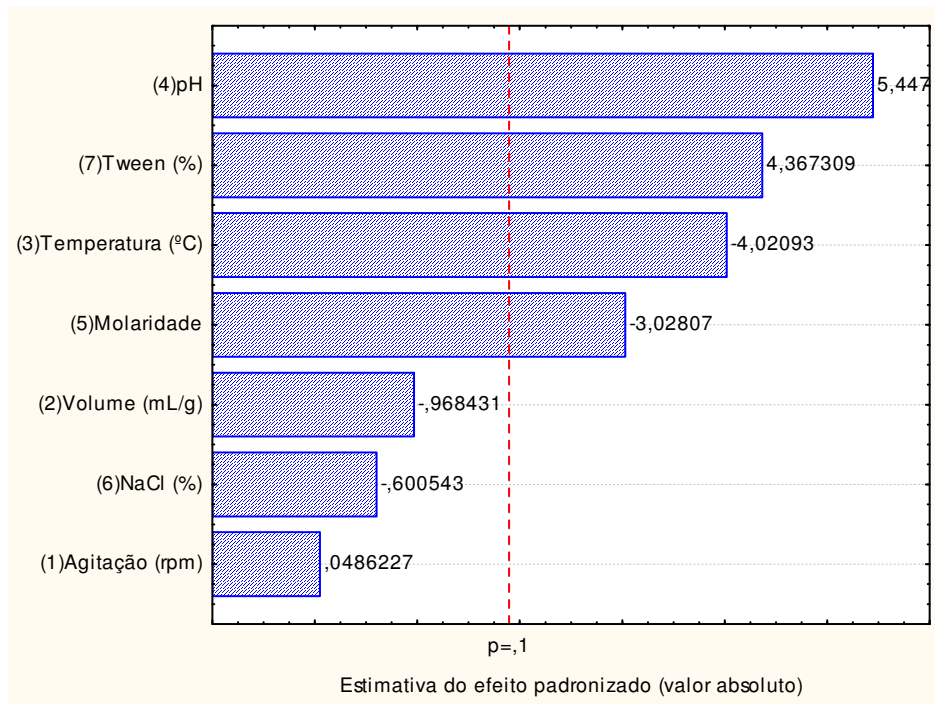
Na primeira etapa do planejamento experimental foram estudadas as variáveis agitação, volume de solvente, temperatura, pH, molaridade do tampão e concentração de NaCl e Tween 80, conforme a Tabela 4.1, a fim de determinar as variáveis significativas para o processo.

As condições de análise e os valores de atividade lipásica recuperada encontram-se descritos na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2:** Valores de atividade lipásica obtidos após o processo de extração para as diferentes condições experimentais do Planejamento tipo Plackett & Burman.

Ensaio	Agitação (rpm)	Volume (mL/g)	Temp, (°C)	pH	Molarida de	Conc, NaCl (%)	Conc, Tween (%)	Atividade Lipásica (U/g)
1	100 (1)	5 (-1)	45 (1)	5 (-1)	0,01 (-1)	0 (-1)	0,2 (1)	50,09
2	100 (1)	9 (1)	25 (-1)	7 (1)	0,01 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	34,18
3	300 (-1)	9 (1)	45 (1)	5 (-1)	0,1 (1)	0 (-1)	0 (-1)	14,11
4	100 (1)	5 (-1)	45 (1)	7 (1)	0,01 (-1)	0,2 (1)	0 (-1)	61
5	100 (1)	9 (1)	25 (-1)	7 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	105,13
6	100 (1)	9 (1)	45 (1)	5 (-1)	0,1 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	18,93
7	300 (-1)	9 (1)	45 (1)	7 (1)	0,01 (-1)	0,2 (1)	0,2 (1)	69,1
8	300 (-1)	5 (-1)	45 (1)	7 (1)	0,1 (1)	0 (-1)	0,2 (1)	64,18
9	300 (-1)	5 (-1)	25 (-1)	7 (1)	0,1 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	45,98
10	100 (1)	5 (-1)	25 (-1)	5 (-1)	0,1 (1)	0,2 (1)	0,2 (1)	64,64
11	300 (-1)	9 (1)	25 (-1)	5 (-1)	0,01 (-1)	0,2 (1)	0,2 (1)	67,05
12	300 (-1)	5 (-1)	25 (-1)	5 (-1)	0,01 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	39,9
13	200 (0)	7 (0)	35 (0)	6 (0)	0,055 (0)	0,1 (0)	0,1 (0)	47,96
14	200 (0)	7 (0)	35 (0)	6 (0)	0,055 (0)	0,1 (0)	0,1 (0)	46,35
15	200 (0)	7 (0)	35 (0)	6 (0)	0,055 (0)	0,1 (0)	0,1 (0)	59,55

A partir da Tabela 5.2 foi possível construir o gráfico de Pareto (Figura 5.4), que mostra os efeitos padronizados e permite identificar as variáveis estatisticamente significativas para o processo, apresentando um nível de significância (p-valor) menor que 0,1.



**Figura 5.4:** Efeitos padronizados das variáveis estudadas, onde  $p$  representa o nível de significância do teste. Termos estatisticamente significativos:  $p$ -valor  $< 0,1$  (90% de confiança).

As variáveis pH e a concentração de Tween 80 apresentaram efeito positivo, indicando que é possível obter melhor recuperação de lipase utilizando os valores máximos (pH 7,0 e concentração de Tween 80 0,2%) ou valores maiores do que os estudados. Por outro lado, a temperatura apresenta efeito negativo, indicando o uso de valores menores para aumentar a extração da enzima.

A análise dos resultados mostra a variável molaridade como significativa e com efeito negativo, provavelmente devido ao fato de que a elevada força iônica ajuda na adsorção de proteínas a superfícies hidrofóbicas, dificultando a extração (MATEO *et al.*, 2007). Apesar disso, a molaridade do tampão foi fixada em 0,1 M, uma vez que menores valores da molaridade causaram a perda de eficácia do tampão e consequentemente alterações no pH do extrato bruto final, podendo essas mudanças no pH afetarem a estabilidade da enzima (GUTARRA *et al.*, 2009). A variável volume não apresentou efeito significativo na extração da lipase na faixa estudada, podendo ser fixada em qualquer valor entre 5 e 9mL por grama de massa seca. Contudo, a razão

volume/massa está diretamente relacionada com a concentração do produto, tornando relevante o estudo deste fator em faixas menores, uma vez que a variável volume apresentou efeito negativo. As variáveis NaCl e agitação não apresentaram efeito significativo na recuperação de lipase sendo então excluídas dos planejamentos seguintes e mantidas a 0% e 200 rpm, respectivamente.

A segunda parte do planejamento experimental consistiu na otimização do processo, onde para tal foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), onde é possível analisar as interações entre as variáveis. Os valores reais e codificados das variáveis testadas estão apresentados na Tabela 4.2. Foi avaliado o efeito das variáveis temperatura, pH, concentração de Tween e volume na recuperação da lipase e na sua estabilidade quando estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 45 dias, conforme a Tabela 5.3.

**Tabela 5.3:** Valores de atividade lipásica obtidos após o processo de extração e atividade residual após 45 dias de estocagem a -20°C para as diferentes condições do DCCR.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Tween (% m/v)	Volume (mL)	Atividade Lipásica (U/g)	Atividade Residual (%) 45 dias
1	27,5 (-1)	6,5 (-1)	0,2 (-1)	4 (-1)	68,11	97,43
2	27,5 (-1)	6,5 (-1)	0,2 (-1)	6 (1)	82,58	81,19
3	27,5 (-1)	6,5 (-1)	0,4 (1)	4 (-1)	82,78	75,31
4	27,5 (-1)	6,5 (-1)	0,4 (1)	6 (1)	86,17	81,15
5	27,5 (-1)	7,5 (1)	0,2 (-1)	4 (-1)	92,93	80,60
6	27,5 (-1)	7,5 (1)	0,2 (-1)	6 (1)	109,81	75,80
7	27,5 (-1)	7,5 (1)	0,4 (1)	4 (-1)	99,72	74,49
8	27,5 (-1)	7,5 (1)	0,4 (1)	6 (1)	106,19	80,58
9	32,5 (1)	6,5 (-1)	0,2 (-1)	4 (-1)	69,29	115,75
10	32,5 (1)	6,5 (-1)	0,2 (-1)	6 (1)	90,23	101,66
11	32,5 (1)	6,5 (-1)	0,4 (1)	4 (-1)	99,42	77,14
12	32,5 (1)	6,5 (-1)	0,4 (1)	6 (1)	96,64	87,41
13	32,5 (1)	7,5 (1)	0,2 (-1)	4 (-1)	83,46	86,11
14	32,5 (1)	7,5 (1)	0,2 (-1)	6 (1)	96,94	91,41
15	32,5 (1)	7,5 (1)	0,4 (1)	4 (-1)	90,78	81,84
16	32,5 (1)	7,5 (1)	0,4 (1)	6 (1)	111,15	78,33
17	25 (-2)	7 (0)	0,3 (0)	5 (0)	106,31	78,07
18	35 (2)	7 (0)	0,3 (0)	5 (0)	101,97	78,89
19	30 (0)	6 (-2)	0,3 (0)	5 (0)	93,89	79,83
20	30 (0)	8 (2)	0,3 (0)	5 (0)	109,22	73,44
21	30 (0)	7 (0)	0,1 (-2)	5 (0)	101,16	57,22
22	30 (0)	7 (0)	0,5 (2)	5 (0)	133,74	48,75
23	30 (0)	7 (0)	0,3 (0)	3 (-2)	81,49	53,65
24	30 (0)	7 (0)	0,3 (0)	7 (2)	110,17	59,32
25	30 (0)	7 (0)	0,3 (0)	5 (0)	95,86	57,59
26	30 (0)	7 (0)	0,3 (0)	5 (0)	106,30	71,93
27	30 (0)	7 (0)	0,3 (0)	5 (0)	82,46	86,89

A partir destes resultados foi realizada uma análise estatística para estimar os efeitos das variáveis e as interações entre elas. Os efeitos padronizados das variáveis ( $t$ ) e o teste de probabilidade de significância ( $p$ ) foram utilizados para avaliar os efeitos do pH, concentração de Tween (Tw), volume (V) e temperatura (T) sobre a recuperação da lipase. Utilizando um nível de confiança de 10% ( $p < 0,1$ ), foi observado que o pH (termo linear), concentração de Tween (termo linear e quadrático) e volume (termo linear) e a interação entre pH e temperatura apresentaram efeito significativo para a recuperação da lipase (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4:** Efeitos padronizados das variáveis (*t*) e o teste de probabilidade de significância (*p*).

Variável	Efeito	Erro Padrão	T	P
pH (L)	12,2	1,91	3,2	0,0042
Conc Tween (L)	12,04	1,91	3,16	0,0047
Conc Tween (Q)	7,84	1,8	2,17	0,0415
Volume (L)	12,54	1,91	3,29	0,0035
pH (L) por T(°C) (L)	-7,78	2,33	-1,67	0,1102

A partir dos resultados obtidos foi possível construir um modelo empírico para recuperação da lipase em função das variáveis temperatura, pH, concentração de Tween e volume (Equação 5.1) que inclui as variáveis estatisticamente e marginalmente significativas, considerando  $p < 0,1$ .

$$L = 92,4 + 6,1 \text{ pH} + 6,0 \text{ Tw} + 3,9 \text{ Tw}^2 + 6,3 \text{ V} - 3,9 \text{ T} \times \text{pH} \quad (\text{Equação 5.1})$$

Onde:

L = Lipase extraída (U/g)

pH = Variável pH (valores codificados)

Tw = Variável concentração de Tween (valores codificados)

T = Variável temperatura (valores codificados)

V = Variável Volume (valores codificados)

O modelo gerado foi considerado preditivo através da análise de variância (ANOVA), pois apresentou um coeficiente de determinação satisfatório ( $R^2=0,7$ ) e valor de teste F (7,71) 3,6 vezes maior do que o valor crítico (2,14) (Tabela 5.5).

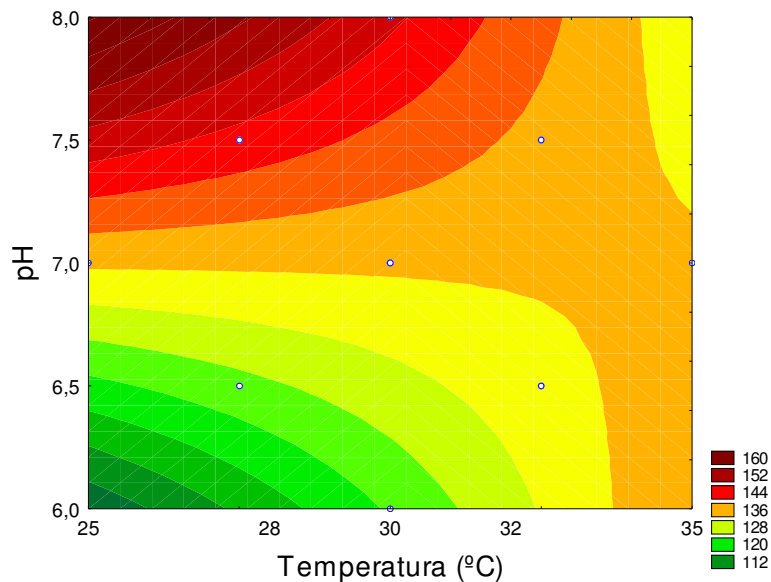
**Tabela 5.5:** Análise de variância (ANOVA) para DCCR.

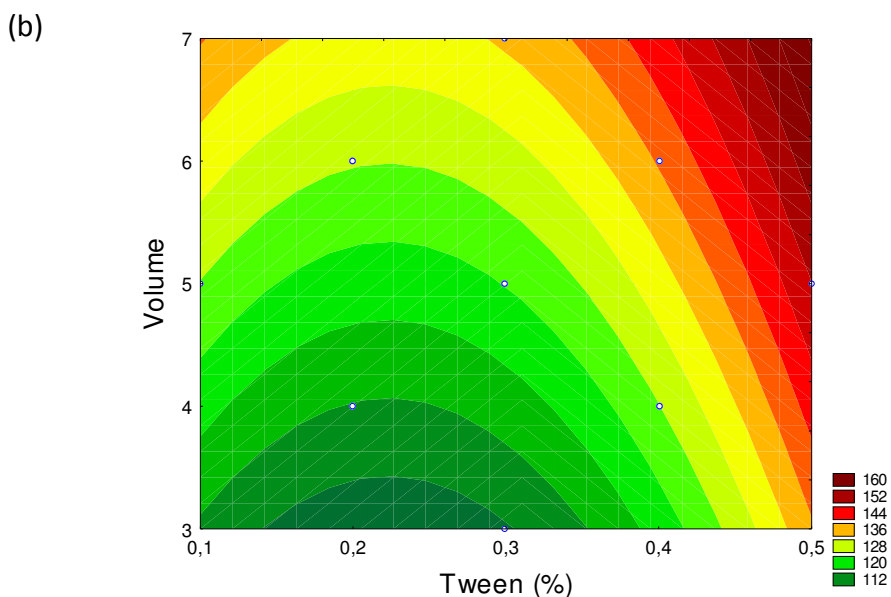
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F
Regressão	3363,4	5	672,7	7,71
Resíduo	1830,2	21	87,2	-
Falta de ajuste	1544,8	19	81,3	-
Erro puro	285,4	2	142,7	-
Total	5193,6	26	-	-

Coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,7$ ; Valor de F = média quadrática da regressão/média quadrática do resíduo ( $F_{0,1;5;21}$ ) = 2,14.

Este modelo permitiu a construção de curvas de contorno, que mostram os valores preditos de atividade lipásica extraída para cada condição estudada (Figura 5.5).

(a)





**Figura 5.5:** Curvas de contorno para atividade lipásica extraída em função das variáveis temperatura e pH (a) e volume e concentração de Tween (b).

Pela análise do efeito e do coeficiente de regressão foi possível observar que o volume, pH e a concentração de Tween foram os fatores que mais influenciaram na extração da lipase. A variável pH mostrou melhores resultados para valores acima de 7,0. A variação do pH da solução de extração causa a mudança da carga superficial da proteína podendo interferir na interação da enzima com a matriz sólida tornando esta mais fraca ou mais forte. Foi observado que o pH ótimo para a extração da lipase não corresponde ao melhor pH para ação e estabilidade desta lipase, que apresenta valores máximos em pH 5 e 6 (GUTARRA *et al.*, 2009). Desta forma, é importante escolher uma condição que promova elevada extração sem afetar a estabilidade da enzima. Resultado semelhante foi observado para a extração da lipase de farelo de soja onde o máximo de lipase foi recuperada em pH 8,5, porém os autores optaram por usar pH 7,0 uma vez que a enzima é mais estável nesta condição (VARDANEGA *et al.*, 2008).

A variável volume foi a de maior significância na concentração final da enzima no extrato bruto, uma vez que uma das vantagens da FES é a obtenção de produtos mais concentrados (MITCHELL *et al.*, 2002). Uma maior extração foi atingida em



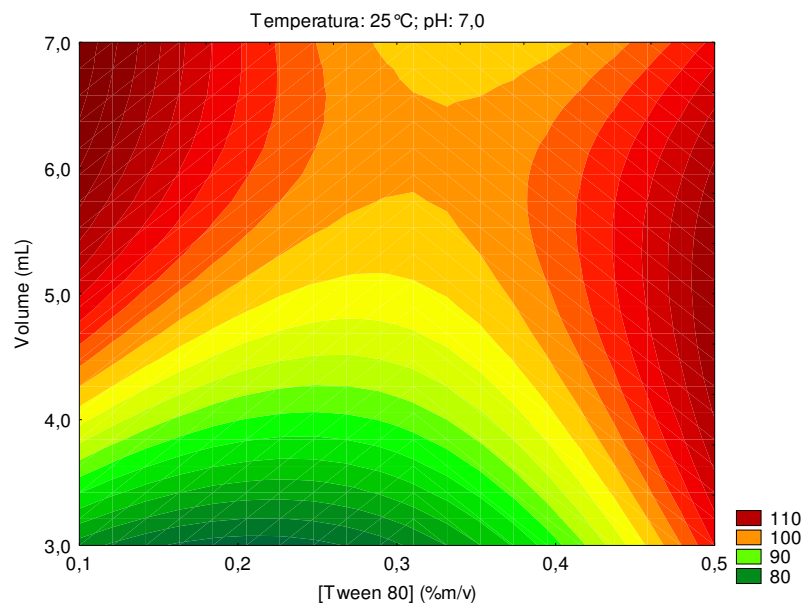
valores maiores que 5 mL, indicando que em valores menores ocorre rápida saturação do solvente, impedindo a extração da lipase. Aikat *et al.* (2000) observaram efeito semelhante para extração de protease encontrando 5 mL/g como condição ótima. Vardanega *et al.* (2008) obtiveram um extrato bruto mais concentrado com um volume mais baixo de solução de extração (4 mL/g).

A adição de Tween 80 à solução de extração apresentou efeito positivo, indicando que altas concentrações deste surfatante podem promover maior extração da lipase. Isto provavelmente ocorre devido à natureza hidrofóbica da lipase ou pela propriedade dos surfatantes de envolver as proteínas extraídas quando as micelas são formadas.

A variável temperatura mostrou melhores resultados em temperaturas menores que 30°C. Isto pode estar relacionado ao efeito de desnaturação de enzimas a alta temperatura. Contudo, sabe-se que a lipase de *P. simplicissimum* apresenta alta estabilidade até 50°C (meia vida de 5 horas em pH 5,0 - Gutarra *et al.*, 2009). Outra hipótese seria a de que em elevadas temperaturas pode ocorrer extração de outros compostos do babaçu, saturando a solução mais rapidamente e dificultando a extração das lipases, como demonstrado por Díaz *et al.* (2007) durante a extração de enzimas hidrolíticas após a fermentação em polpa de uva, e por Singh *et al.* (1999), utilizando farelo de trigo. Vardanega *et al.* (2008) também obteve elevada extração de lipase em temperaturas mais brandas (25°C) porém, neste caso, a lipase de *Penicillium* sp. é mais estável a esta temperatura.

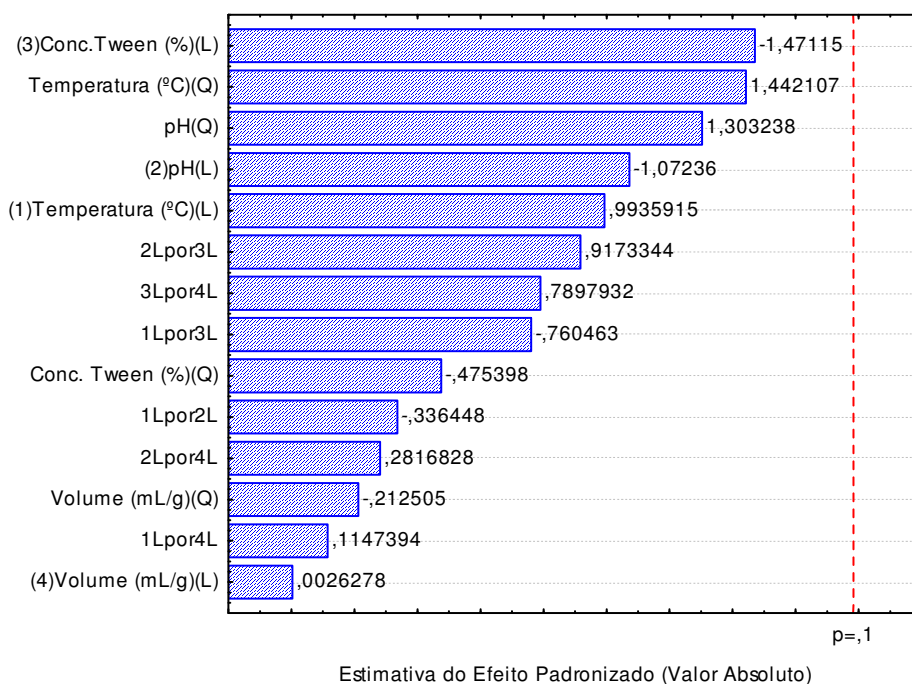
Através da análise dos resultados do planejamento experimental foi possível obter valores máximos de atividade em temperaturas entre 25 e 30°C, pH entre 7 e 8, volume de 5 a 7 mL/g de massa seca e concentração de Tween de 0,5% (m/v).

Analisando a interação entre a concentração de Tween e volume fixando o pH do tampão de extração em 7,0, que é próximo ao encontrado no efluente, e a temperatura em 25°C (temperatura ótima de extração) foi possível encontrar duas regiões de ótimo (Figura 5.6). A fim de combinar eficiência de extração com redução de custos para o tratamento do efluente, a região de concentração máxima de Tween 80 e volume de 3mL permite a obtenção de um extrato enzimático concentrado e com elevada atividade lipásica, o que possivelmente levará a aplicação de um menor volume de enzima para o tratamento do efluente.



**Figura 5.6:** Curva de contorno para atividade lipásica em função das variáveis volume e concentração de Tween.

Os efeitos das variáveis temperatura, pH, concentração de Tween e volume na estabilidade da lipase após estocagem do extrato bruto a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 45 dias também foi avaliado no DCCR. As condições de análise e os valores de atividade residual (%) após estocagem estão descritos na Tabela 5.3. As variáveis estudadas e suas interações não apresentaram efeito significativo na estabilidade da lipase (Figura 5.7). Este resultado indica que a alteração dos valores das variáveis (dentro da faixa estudada) não causa efeito na estabilidade da lipase e que, para a maioria das condições estudadas, mais de 70% de atividade residual pode ser obtida após estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 45 dias.



**Figura 5.7:** Efeitos padronizados das variáveis estudadas, onde p representa o nível de significância do teste. Termos estatisticamente significativos: p-valor < 0,1 (90% de confiança).

### 5.5. Obtenção do extrato bruto para hidrólise enzimática de efluente da indústria de abate de aves

Após a etapa de otimização, foi realizada uma validação do processo, onde foi possível comparar os valores de atividade preditos pelo modelo estatístico gerado com os valores encontrados (Tabela 5.6).

**Tabela 5.6:** Valores de atividade preditos e encontrados.

Ensaio	T (°C)	pH	[Tween]	Volume	Atividade	Atividade	Atividade Encontrada
			(%p/v)	(mL)	Esperada (U/g)	Encontrada (U/g)	(U/mL)
1	32,5	6,5	0,2	4	69,3	81	20,3
2	25	6	0,1	3	55,6	61,5	20,5
3	25	7	0,5	3	107,4	92	30,7

Pela análise da Tabela 5.6 foi possível a obtenção de um extrato bruto com elevado valor de atividade lipásica, tendo como temperatura de extração 25°C, aproximadamente a temperatura ambiente (ensaio 3). Esta condição de extração ainda permite obter um extrato enzimático mais concentrado que os demais, com cerca de 30 U/mL. Assim, foi utilizado para as etapas posteriores do trabalho uma enzima extraída com 3 mL/g massa seca, temperatura de 25°C, pH 7,0 e concentração de Tween 80 de 0,5% (m/v). Nesta condição, a variável volume não foi utilizada em seu valor ótimo, porém, levando-se em consideração os custos do processo, foi escolhido um ponto onde foi possível combinar volume reduzido e elevada atividade enzimática.

### **5.6. Determinação do tempo de hidrólise enzimática**

Foi realizado um estudo a fim de obter o tempo de hidrólise máxima, utilizando como condições de ensaio um volume de 1 e 5 mL de preparado enzimático líquido (PEL) para cada 100 mL de efluente, caracterizado após duas coletas na indústria de abate de aves, conforme Tabela 5.7. Para esta etapa, também foi feita a medida de atividade utilizando o método titulométrico, obtendo-se um extrato contendo um valor médio de 4,7 U/mL (ou 14,1 U/g). Foram analisados os tempos de 4, 8 e 24 h de hidrólise. Conforme observado na Tabela 5.8, tanto para o volume de 1 mL quanto para o de 5 mL, foi possível obter o máximo de hidrólise no tempo de 8 horas.

**Tabela 5.7:** Caracterização do efluente

Variável	Média ± ΔP
pH	6,4±0,1
T (°C)	33
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	8692±1262
O&G(mg/L)	2403 ± 521
ST(mg/L)	6717±3049
SF(mg/L)	1807±151
SV(mg/L)	4910±2898
NT (mg/L)	434±2
PT (mg/L)	6,5±0,7

Fonte: Damasceno, 2010.

**Tabela 5.8:** Teor de Ácidos Livres (μmols/mL)

Tempo (h)	1 mL de PEL	5mL de PEL	Δ(1mL)	Δ(5mL)
0	30,5	30,5	0	0
4	31,2	31,5	0,7	1,0
8	34,4	41,3	3,9	10,8
24	28,7	33,7	--	3,2

Δ: Variação entre os tempos de 4,8 e 24 horas e o tempo 0.

Valladão *et al.* (2007) encontraram valores de hidrólise máxima em um tempo de 22 horas, utilizando lipase de *P. restrictum* para tratamento de efluentes de abatedouro de aves, obtendo um valor máximo de 7 mmols de ácidos livres/mL, para uma concentração de 1200 mg O&G/L. Utilizando o mesmo preparado enzimático, Leal *et al.* (2006) obtiveram valores ótimos após 12 h de hidrólise de efluente proveniente da indústria de laticínios.

### 5.7. Otimização da Hidrólise enzimática de efluentes da indústria de abate de aves

Os testes de hidrólise enzimática com o efluente da indústria de abate de aves, contendo 2034 mg O&G/L, foram realizados conforme descrito anteriormente na Tabela 4.3, a fim de determinar as variáveis estatisticamente significativas para o processo. As condições de análise e os teores de ácidos liberados encontram-se descritos na Tabela 5.9.

**Tabela 5.9:** Condições de análise e respostas.

Ensaio	Volume PEL (mL)	[Bioss] (%v/v)	Temperatura (°C)	Ácidos Livres (μmols/mL)*
1	3,8	0,10	34	8,73
2	6,2	0,10	34	10,07
3	3,8	0,40	34	6,81
4	6,2	0,40	34	13,97
5	3,8	0,10	46	10,94
6	6,2	0,10	46	13,29
7	3,8	0,40	46	6,00
8	6,2	0,40	46	8,41
9	5,0	0,25	40	7,2
10	5,0	0,25	40	6,97
11	5,0	0,25	40	6,92

\*Diferença entre amostra e controle após 8 horas de reação

A partir destes resultados foi realizada uma análise estatística para estimar os efeitos das variáveis e as interações entre elas. Os efeitos padronizados das variáveis ( $t$ ) e o teste de probabilidade de significância ( $p$ ) foram utilizados para avaliar os efeitos da concentração de biossurfatante, volume de PEL e temperatura sobre a hidrólise do efluente. Utilizando um nível de confiança de 10% ( $p < 0,10$ ), foi observado

que a interação entre o volume de PEL e a concentração de biossurfatante e a interação entre biossurfatante e temperatura apresentaram efeito significativo para a hidrólise do efluente (Tabela 5.10).

**Tabela 5.10:** Efeitos padronizados das variáveis (*t*) e o teste de probabilidade de significância (*p*).

Variável	Efeito	Erro Padrão	t	p
Volume de PEL	2,75	1,00	2,73	0,0525
Conc Biossurfatante	-2,52	1,00	-2,51	0,0663
Temperatura	-1,93	1,00	-1,91	0,1280
Volume PEL por Conc Biossurfatante	2,04	1,00	2,01	0,1135
Conc Biossurfatante por Temperatura	-3,52	1,00	-3,49	0,0251

A partir dos resultados obtidos foi possível construir um modelo empírico para a quantificação dos ácidos liberados em função das variáveis volume de PEL, concentração de biossurfatante e temperatura (Equação 5.2) que inclui as variáveis estatisticamente e marginalmente significativas, considerando  $p < 0,1$ .

$$AL = 8,48 + 1,38 PEL - 1,26 B - 0,97 T + 1,01 PEL \times B - 1,75 B \times T \quad (\text{Equação 5.2})$$

Onde:

AL = Ácidos liberados (mmol/mL)

PEL = Variável Volume de PEL (valores codificados)

T = Variável Temperatura (valores codificados)

B = Variável Concentração de biossurfatante (valores codificados)

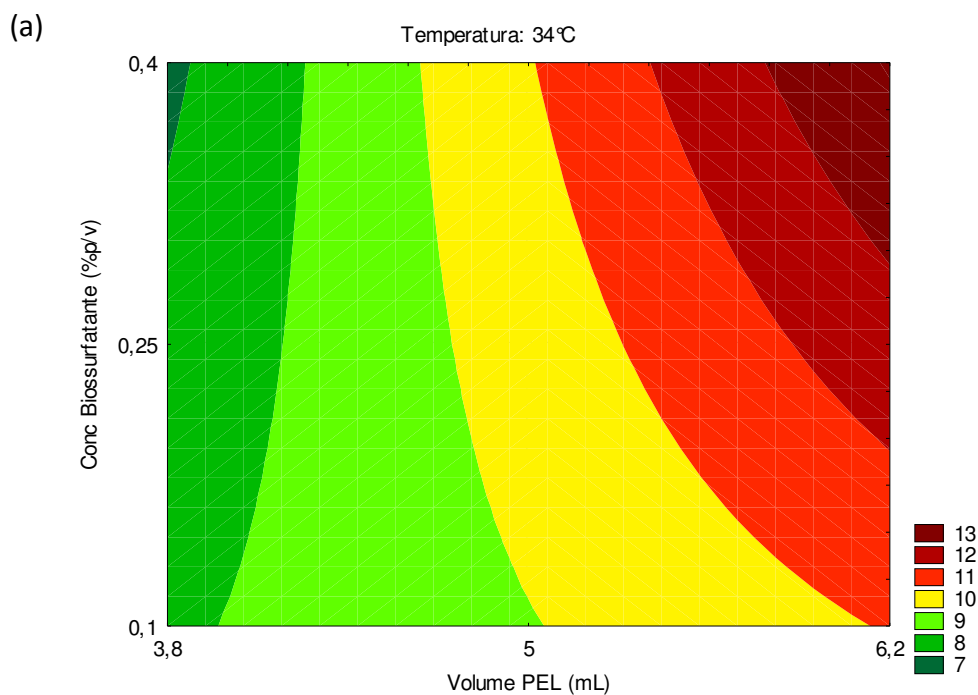
O modelo gerado foi considerado preditivo através da análise de variância (ANOVA), pois apresentou coeficiente de determinação satisfatório ( $R^2=0,84$ ) e valor de teste F (5,4), maior do que o valor crítico (5,05) (Tabela 5.11).

**Tabela 5.11:** Análise de variância (ANOVA) para DCCR.

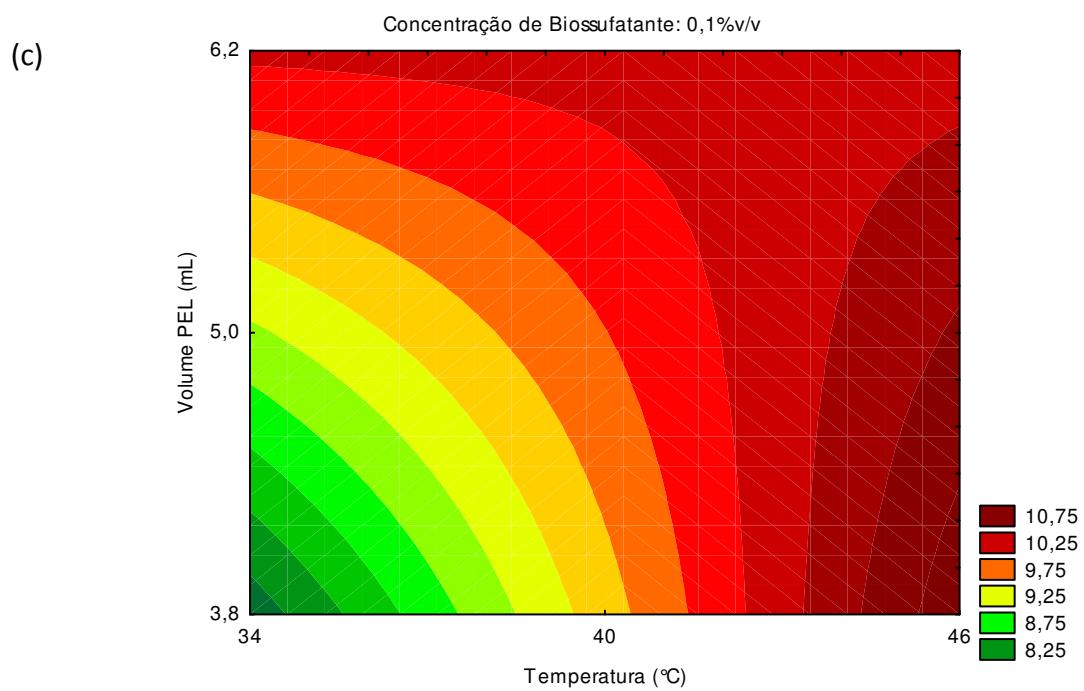
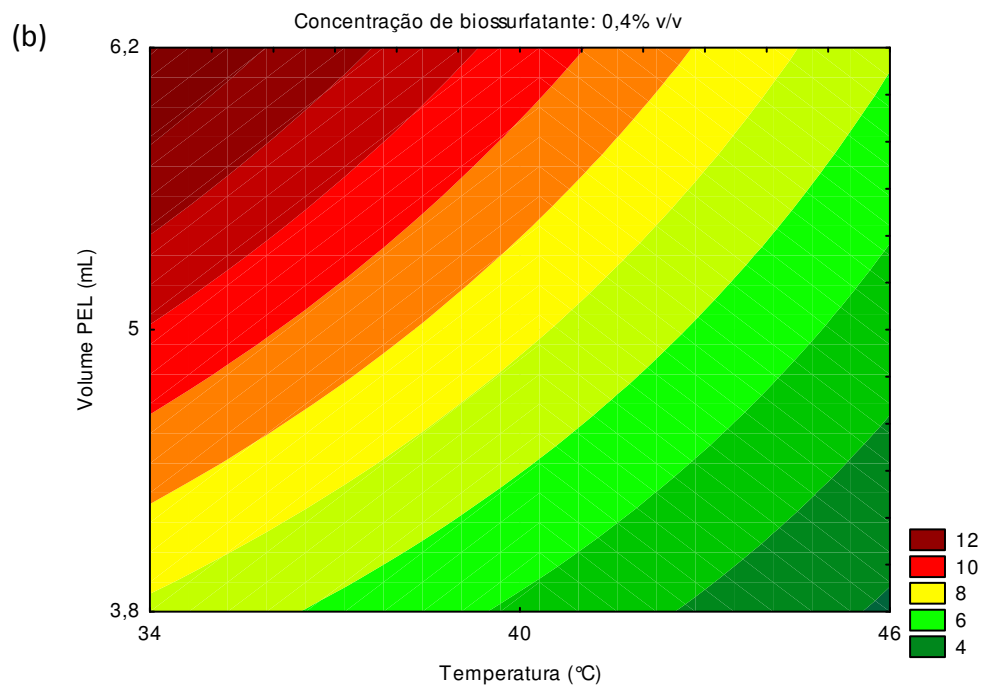
Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F
Regressão	68,31	5	13,66	5,4
Resíduo	12,63	5	2,53	-
Falta de ajuste	11,93	3	3,97	-
Erro puro	0,70	2	0,35	-
Total	80,94	10	-	-

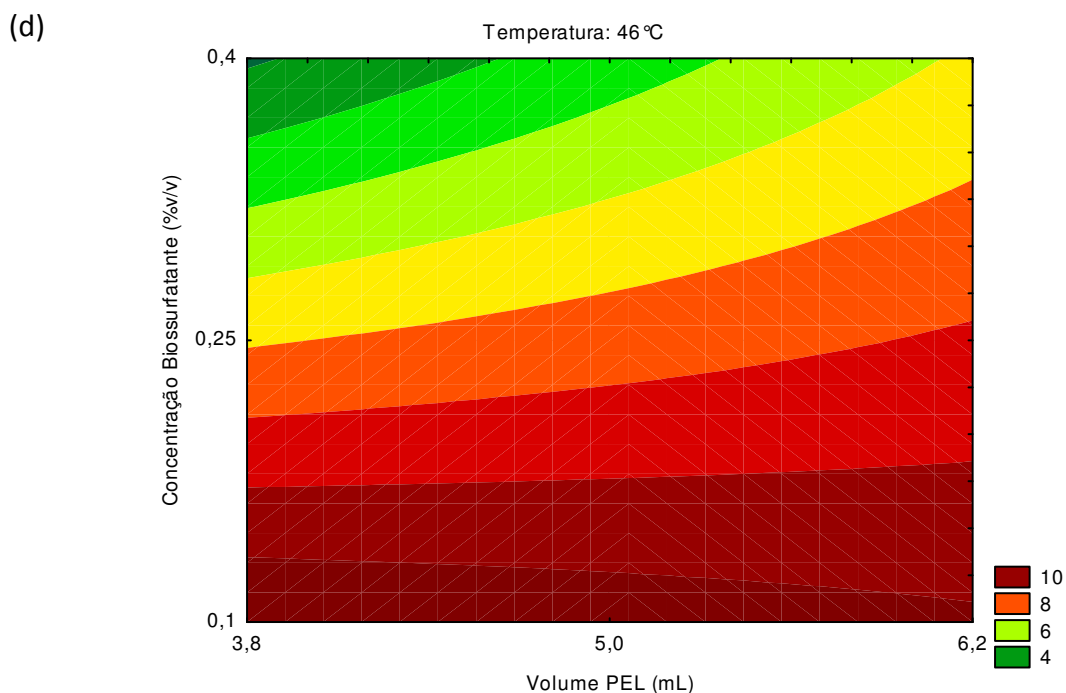
Coefficiente de determinação:  $R^2 = 0,84$ ; Valor de F = média quadrática da regressão/média quadrática do resíduo ( $F_{0,05;5;5} = 5,05$ ).

Este modelo permitiu a construção de curvas de contorno, que mostram os valores preditos de atividade lipásica para cada condição estudada (Figura 5.7).









**Figura 5.8:** Curvas de contorno para a hidrólise do efluente em função das variáveis: concentração de biosurfatante e volume de PEL para temperatura de 34°C (a), volume de PEL e temperatura para a concentração de biosurfatante de 0,4%v/v (b), volume de PEL e temperatura para a concentração de biosurfatante de 0,1%v/v (c) e concentração de biosurfatante e volume de PEL para temperatura de 46°C (d).

Pela análise da Tabela 5.10 é possível concluir que todas as variáveis analisadas mostraram-se significativas para o processo. A variável volume de PEL foi a de maior significância para o processo de hidrólise do efluente. A interação entre biosurfatante e temperatura foi de grande significância. Conforme a Figura 5.8 a é possível observar que utilizando-se a temperatura de 34°C é possível obter altos valores de hidrólise aplicando a concentração máxima de biosurfatante (dentro da faixa estudada), com o máximo de volume de PEL, observando-se a diminuição dos valores de hidrólise com o aumento da temperatura mantendo-se as condições de volume de enzima e concentração de biosurfatante no nível mais alto (Figura 5.8, b). Isso poderia ser explicado pela desativação da enzima pela temperatura, porém sabe-se que o preparado enzimático utilizado no presente trabalho apresenta atividade ótima em 50°C (GUTARRA *et al.*, 2009). Observa-se também nas Figuras 5.8, c e d que altos

valores de ácidos livres são obtidos em temperatura alta empregando baixa concentração de biossurfatante e baixo volume de enzima. Isso poderia ser explicado pelo aumento da solubilidade dos óleos e graxas do efluente com o aumento da temperatura e redução da concentração de biossurfatante necessária para manter a qualidade da emulsão e conseqüentemente acesso da enzima ao substrato, aliado à uma boa atividade da enzima em temperaturas mais altas. Estes resultados indicam duas condições ótimas (máximo de hidrólise em 8h), uma a 34°C que posteriormente seguiria para um tratamento biológico com microbiota mesófila e um a 46°C que seguiria para um tratamento com microbiota termófila.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia Ambiental vem estudando a utilização de lipases obtidas por fermentação em estado sólido por diversos microorganismos. Leal (2000), utilizando o PEL de *P. restrictum* obtido por FES em babaçu (2,1 U/mL) e um efluente de laticínio com máximo de gordura de 1200 mg O&G/L, obteve um teor de ácidos livres de aproximadamente 40 µmol/mL com 10% (v/v) de extrato enzimático, após 8 horas de reação. Valladão (2009), utilizando um preparado enzimático sólido (PES – 26,3 U/g) do mesmo fungo para o tratamento enzimático de efluente proveniente da indústria de abate de aves contendo 800mg O&G/L, obteve um teor de ácidos graxos livres de 6 mmols/mL em um período de 8 horas de hidrólise aplicando 1,0% (m/v) de PES, sendo este valor menor que o obtido no presente estudo para o efluente da mesma indústria de abate de aves e com PES de *P. simplicissimum*, com produção de ácidos livres variando de 7 a 14 µmol/mL. Tal resultado denota que os estudos de otimização da extração da enzima como também da hidrólise enzimática conduzidos neste trabalho surtiram efeitos positivos, gerando melhores resultados na etapa de hidrólise enzimática da gordura presente no efluente.

A hidrólise de efluente de abatedouro apresenta menor produção de ácidos livres em comparação à encontrada nos efluentes de laticínio (LEAL, 2000). Isto pode ser explicado pela menor afinidade entre a lipase de *P. simplicissimum* e os substratos presentes no efluente de abatedouro, o que indica que a hidrólise depende não somente da enzima utilizada como também da concentração do efluente empregado.

## 5.8. Ensaio de biodegradabilidade anaeróbia

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia foram realizados após a etapa de otimização da hidrólise enzimática utilizando dois pontos, um apresentando alto teor de ácidos liberados (ponto 1) e outro com um teor médio (ponto 2) a fim de combinar uma boa eficiência de hidrólise com uma alta produção específica de metano (PEM), uma vez que os ácidos liberados durante a etapa de hidrólise enzimática podem ser inibidores da etapa de digestão anaeróbia (KOSTER E CRAMER, 1987). Estes pontos foram selecionados fixando a temperatura a 34°C uma vez que foi empregada uma microbiota mesófila neste ensaios. O ponto 1 teve como condições de hidrólise a temperatura de 34°C, 0,4% v/v de biossurfatante e um volume de enzima de 6,2 mL/100mL de efluente, obtendo um teor de ácidos liberados de 14 mmol/mL; já para o ponto 2 foi utilizada a mesma temperatura porém com 0,4% v/v de biossurfatante e 3,8 mL de enzima para cada 100mL de efluente, obtendo um teor de ácidos liberados de aproximadamente 8  $\mu$ mol/mL.

A Figura 5.9 mostra o perfil de produção de biogás gerado durante a etapa de digestão anaeróbia dos efluentes em cada uma das condições avaliadas. E a Tabela 5.12 apresenta os resultados em termos de remoção de DQO e produção específica de metano.

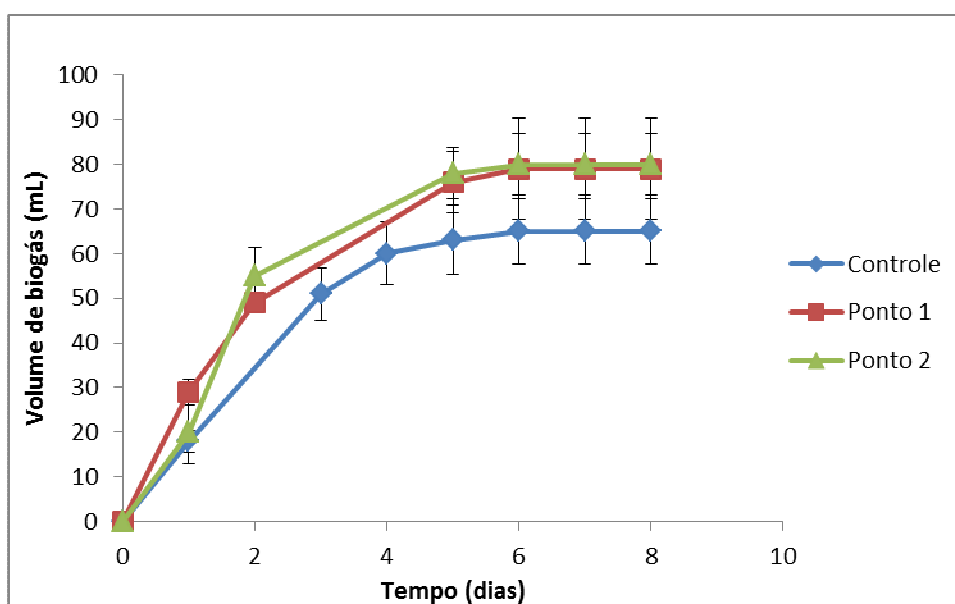


Figura 5.9: Perfil de produção de biogás.

**Tabela 5.12:** Resultados dos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia

Condição	pH final	DQO inicial (mg/L)	DQO final (mg/L)	Remoção DQO (%)	Volume biogás (mL)	% CH4	Volume CH4 (mL)	PEM* (mL CH <sub>4</sub> /g DQO)
Controle	7,2	3400	240	93	65	nd	nd	0
Ponto 1	7,0	6147	412	93	79	80	63	122
Ponto 2	7,0	4867	304	94	80	82	66	161

\*Produção específica de Metano; nd = não detectado.

Pela análise da Tabela 5.12 pode-se observar que para o efluente hidrolisado (pontos 1 e 2) foi possível obter um volume de metano, principal produto desta etapa de tratamento. No efluente previamente hidrolisado, com a redução do teor de gordura, a alta remoção de DQO indica a eficiência do tratamento enzimático e a ausência de inibição das arqueas metanogênicas pela presença de ácidos graxos de cadeia longa (KOSTER E CRAMER, 1987). A produção específica de metano foi maior para o efluente com menor teor de ácidos liberados (ponto 2), uma vez que estes inibem as arqueas metanogênicas.

Já para o experimento Controle (sem hidrólise enzimática) houve redução de DQO, porém não foi possível detectar produção de metano. Isto se deve ao fato do efluente apresentar elevado teor de gordura (2034 mg O&G/L), que pode ter permanecido adsorvida no lodo ou na parede dos frascos utilizados para o teste. Desta forma, é possível observar remoção de DQO no efluente, porém não significa que esta matéria orgânica foi metabolizada (para geração de metano e outros gases). Também é possível detectar produção de gases no experimento controle que incluem CO<sub>2</sub> (detectado na cromatografia) e possivelmente H<sub>2</sub> e ácidos voláteis provenientes da etapa de acidogênese.

## 6. Conclusões

- Foi possível produzir lipase de *Penicillium simplicissimum* por fermentação em estado sólido em um tempo ótimo de 48h utilizando torta de babaçu como meio basal, um rejeito abundante e de baixo custo.
- Após otimização do processo de extração foi possível obter um extrato enzimático concentrado e com elevada atividade lipásica empregando: tempo de extração de 40 minutos, volume de 3mL/g, 0,5% de Tween 80, 25°C, pH 7,0, agitação de 200rpm e molaridade do tampão de 0,1M.
- Na etapa de hidrólise do efluente da indústria do abate de aves melhores resultados foram obtidos em temperaturas de 34°C e 0,4% de biossurfatante e 6,2mL do extrato bruto/100mL de efluente ou a 46°C e 0,1% de biossurfatante e 3,8mL do extrato bruto/100mL de efluente.
- O emprego da etapa de pré-hidrólise em duas condições diferentes de concentração de enzima e biossurfatante à temperatura de 34°C com posterior tratamento anaeróbio do efluente, possibilitou a remoção de DQO e a produção de metano, enquanto o efluente não hidrolisado, apesar de ter apresentado remoção de DQO, não apresentou produção de metano.

## **7. Etapas Futuras**

- Investigar a remoção DQO e ausência de produção de metano no controle;
- Medir o teor de óleo e graxas presentes nos frasco de penicilina após a etapa de digestão anaeróbia;
- Realizar hidrólise e ensaio de biodegradabilidade a temperatura de 46°C.

## 8. Referências Bibliográficas

- Aikat, K. and Bhattacharyya, B.C. *Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of Rhizopus oryzae and growth studies by the soft gel technique*. *Process Biochemistry*, vol. 35, p. 907-914, 2000.
- Aitken, M.D. *Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles*. *The Chemical Engineering Journal*, vol. 52, p. B49-B58, 1993.
- ALEXANDER, M. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, 2ª ed., San Diego, USA, 453 p. 1999.
- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18th ed., New York, 2005.
- Avicultura Industrial. *Produção de frango cresce em 2009*. Disponível em: <[HTTP//aviculturabrasileira.com](http://aviculturabrasileira.com)>
- Banat, I. M; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. *Potential commercial applications of microbial surfactants*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 53, p. 495-508, 2000.
- Bancerz, R., Ginalska, G., Fiedurek, J., Gromada, A. *Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. vol.32, p.253–260. 2005.
- Berglund, P., Hutt, K. *Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. Stereo-selective biocatalysis*. New York: Marcel Dekker, p. 1187-1188, 2000.



- Blundi, C. E., Utida, M. M. *Utilização de enzimas na degradação aeróbia de substrato multicomposto*. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, 2(3), p. 100-104. 1997.
- Cammarota, M.C., Teixeira, G.A., Freire, D.M.G. “*Enzymatic pre hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents*”. Biotechnology Letters, vol. 23, p. 1591-1595, 2001.
- Cammarota, M. C., Freire, D. M. G. *A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewaters with high oil and grease content*. Bioresource Technology, vol. 97, p. 2195-2210, 2006.
- Cavalcanti, E. D C, Maciel, F. M., Villeneuve, P., Lago, R. C. A., Machado, O. L., Freire, D. M. G. *Acetone Powder from Dormant Seeds of Ricinus communis L.: Lipase Activity and Presence of Toxic and Allergenic Compounds*. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol.136, p.57 – 65. 2007.
- Castilho, L.R., Medronho, R.A., Alves, T.L.M. *Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with Aspergillus niger*. Bioresearch Technology, vol. 71, p.45-50. 2000a.
- Castilho, L.R., Polato, C.M.S., Baruque, E.A., Sant'Anna Jr, G.L., Freire, D.M.G. *Economic analysis of lipase production by Penicillium restrictum in solidstate and submerged fermentations*. Biochemistry Engineering Journal. vol. 4, p.239-247. 2000b.
- Couto, S.R., Sanronmán, M. A. *Application of solid-state fermentation to food industry - a review*. Journal of Food Engineering. vol. 76, p.291-302. 2006.
- Chernicharo, C. A. L. *Reatores Anaeróbios*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, p. 246. 1997.

- Crecchio, C., Ruggiero, P., Pizzigallo, M. D. R. *Polyphenoloxidases immobilized in organic gels: properties and applications in the detoxification of aromatic compounds*. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 48, p. 585-591. 1995.
- Damasceno, F. R. C. *Aplicação de preparado enzimático e biossurfatante no tratamento anaeróbio de efluente com alto teor de gordura – um estudo de viabilidade técnica e econômica*. Exame de qualificação do Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. EQ/UFRJ. 73pp. 2010.
- Díaz, J. C. M., Rodríguez, J. A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. *Lipase from the thermotolerant fungus Rhizopus homothallicus is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, p.1042–1050. 2006
- Díaz, A.B., Caro, I., Ory I., Blandino, A. *Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace*. *Enzyme Microbial Technology*, vol. 41, p.302–306. 2007.
- Durand, A. *Bioreactor designs for Solid state fermentation*. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, p. 113-125. 2003.
- Edelmann, W., Schleiss, K., Joss, A.,. *Ecological, energetic and economic comparison of anaerobic digestion with different competing technologies to treat biogenic wastes*. *Water Science and Technology*. vol.41 (3), p.263–273. 2000
- Fernandez-Lafuente, R., Armisén, P., Sabuquillo, P., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M. *Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports*. *Chemistry and Physics of Lipids*. vol. 93. P.185–197. 1998.

- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B. *What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach*. *Biochimie*, vol. 82, p. 1033–1041. 2000.
- Freire, D.M.G, Teles, E.M.F., Bon, E.P.S., Sant'Anna Jr., G.L. *Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: Media composition, agitation and aeration*. *Applied Biochemistry Biotechnology*. vol. 63, p. 429-421. 1997a.
- Freire, D.M.G., Gomes, P.M., Bon, E.P.S., Sant'Anna Jr., G.L. *Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum**. *Brazilian Journal Microbiology*, vol. 28, p.6-12. 1997b.
- Freire, D.M.G., Castilho, L.R. *Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido*. *Revista Brasileira Farmácia*. V. 81, n. 1-2, p. 48-56. 2000.
- Freire, D. M. G., Castilho, L. R. *Lipases em Biocatálise In: Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*. 1ª Ed, Rio de Janeiro: Editora Interciência, vol.1, p. 369-385, 2008.
- Godoy, M.G. *Produção de lipases microbianas e detoxificação simultânea de rejeitos agroindustriais*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Rio de Janeiro, Brasil, 116 pp. 2009.
- Gutarra, M.L.E., Cavalcanti, E.D.C., Freire, D.M.G., Castilho, L.R., Sant'anna JR, G.L. *Lipase production by solid state fermentation: cultivation conditions and operation of a packed-bed bioreactor*. *Applied Biochemistry. Biotechnology*, V. 121, p. 105-116. 2005.
- Gutarra, M.L.E. *Produção de lípase pelo fungo *Penicillium simplicissimum*: Caracterização do processo fermentativo e do produto e desenvolvimento de biorreator para fermentação no estado sólido*. Tese de doutorado,

Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Rio de Janeiro, Brasil, 156pp. 2007.

Gutarra, M. L. E., Godoy, M. G., Silva, J. N., Guedes, I. A., Lins, U., Castilho, L. R., Freire, D., M., G. *Lipase production and Penicillium simplicissimum morphology in solid-state and submerged fermentations*. Biotechnology Journal. vol.4, p.1450–1459. 2009a.

Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G., Maugeri, F., Rodrigues, M.I., Freire, D.M.G. and Castilho, L.R. *Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus Penicillium simplicissimum by solid-state fermentation*. Bioresource Technology. 2009b.

Hasan, F., Shah, A.A., Hammed, A. *Industrial applications of microbial lipases*. Enzyme and Microbial Technology, vol. 39, p 235–251. 2006.

Heck, J. X., Hertz, P. F., Ayub, M. A. Z. *Extraction optimization of xylanases obtained by solid-state cultivation of Bacillus circulans BL53*. Process Biochemistry. vol. 40, p.2891–2895. 2005.

Hölker, U., Lenz, J. *Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages?* Current Opinion Microbiology, vol. 8, p.301-306. 2005.

Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. *Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi*. Applied Microbiology Biotechnology, vol. 64, p.175-186. 2004.

Ibrik, A., Chahinian, H., Rugani, N., Sard, L., Comeau, L. C. *Biochemical and Structural Characterization of Triacylglycerol Lipase from Penicillium cyclopium*. Lipids. vol. 33, p. 377–384. 1998.

- Illanes, A. *Producción de enzimas. In: Biotecnología de Enzimas.* Ediciones Universitarias de Val Paraíso (Ed). Monografía nº 35, p. 45-54. 1994.
- Jaeger, K-E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. *Bacterial Biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases.* Annual Review Microbiology, vol. 53, p.315-351. 1999.
- Jordan, S. N., Mullen, G. J. *Enzymatic hydrolysis of organic waste materials in a solid-liquid system.* Waste Management, vol. 27, p. 1820-1828. 2007.
- Jung, F., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G. "Impact of enzymatic prehydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters", Biotechnol. Letters, vol. 24, p. 1797-1802, 2002.
- Karam, J., Nicell, J.A. *Potential application of enzymes in waste treatment.* Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 69, p. 141-153, 1997.
- Katz, L., Marcin, C., Zitano, L., King, J., Price, K., Grinberg, N., Bhupathy, M., Mc Namara, J., Bergan, J., Greasham, R., Chartrain, M. *Screening and selection of a microbial lipase for the stereospecific hydrolysis of Verlukast.* Journal Industrial Microbiology, vol. 11, p.89-94. 1993.
- Koster, I.W., Cramer, A. *Inhibition of methanogenegis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids.* Applied and Envirmental Microbiology, vol. 53, p. 403-409. 1987.
- Kronemberger, F. A., Santa Anna, L. M., Fernades, A. C. L. B., Menezes, R. R. M., Borges, C. P., Freire, D. M. G. *Oxygen-controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor.* Applied Biochemistry & Biotechnology, vol. 147, p. 33 - 45, 2008.

- Leal, M. C. M. R. *Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios*. Tese de Mestrado. Programa de Engenharia Química da COPPE. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 111pp, 2000.
- Leal, M. C. M. R., Freire, D. M. G, Cammarota, M. C., Sant'Anna Jr, G. L. *Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater*. *Process Biochemistry*, vol. 41, p. 1173-1178, 2006.
- Lettinga, G., Hulshof P., Zeemang, W. *Biological Wastewater Treatment. Part I: Anaerobic wastewater treatment*. Lecture Notes. Wageningen Agricultural University. 1996.
- Li, N., Zong, M. *Lipases from the genus Penicillium: Production, purification, characterization and applications*. *Journal of Molecular Catalysis*, vol. 66, p. 43-54. 2010.
- Lucas, A. P. C., Koetz, P. R., Przybylski, S. L. A. *Tratamento anaeróbio de efluentes do processamento de corvina (Micropogonias furnieri) em reator UASB*. *Vetor*, vol. 10, p. 113-124, 2000.
- Macedo, G.A., Lozano, M.M.S., Pastore, G.M. *Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from Rhizopus sp.*. *Journal Biotechnology*, vol. 6, n. 1, p. 69-72. 2003.
- Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M., Gokhale, D. V. *Production of acidic lipase by Aspergillus niger in solid state fermentation*. *Process Biochemistry*. vol. 38, p. 715-721. 2002.
- Masse, L., Massé, D.I., Kennedy, K.J. *Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater*, *Process Biochemistry*, vol. 38, p. 1365-1372, 2003.

- Masse, L., Masse, D. I. *Effect of soluble organic, particulate organic, and hydraulic shock loads on anaerobic sequencing batch reactor treating slaughterhouse wastewater at 20°C*. Process Biochemical, vol. 40, p. 1225-1232, 2005.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., Fernandez-Lafuente, R. *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. Enzyme and Microbial Technology. vol. 40, p. 1451–1463. 2007.
- Mendes, A. A., Castro, H. F., Pereira, E. B., Furigo Jr., A. *Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios*. Química Nova, vol. 28. P. 296-305. 2005.
- Millioli, V.S., Servulo, E. F. L. C., Sobral, L. G. S., Carvalho, D. D., *Bioremediation of crude oil-bearing soil: evaluating the Effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude Oil biodegradation efficiency*. Global NEST Journal, vol. 11, nº 2, p. 181-188, 2009.
- Mitchell, D.A., Berovic, M., Krieger, N. *Overview of solid state bioprocessing*. Biotechnology Annual Reviews, vol. 8, p. 183-225, 2002.
- Motta, M., Pons, M.N., Roche, N. *Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso*. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, vol. 8, nº 3, p.170-181, 2003.
- Nakhla, G., Al-Sabawi, M., Bassi, A. Liu, V. *Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater*. Journal of Hazardous Materials, vol. B102, p. 243–255, 2003.
- Nitschke, M, Pastore G.M. *Biosurfatantes: Propriedades e Aplicações*. Química Nova, Campinas/SP, vol. 25, nº 5, p. 772-776, 2002.

- Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O. *Biosurfactants in food industry*. Trends in Food Science & Technology, vol. 18, p. 252-259, 2007.
- Palomo, J. M., Peñas, M. M., Fernández-Lorente, G., Mateo C., Pisabarro, A. G., Fernández-Lafuente, R., Ramírez, L., Guisán, J. M. *Solid-Phase Handling of Hydrophobins: Immobilized Hydrophobins as a New Tool To Study Lipases*. Biomacromolecules. vol. 4, p. 204-210. 2003.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Krieger, N., Fontana, J.D. *Recent developments in microbial inulinases – its production, properties and industrial applications*. Appl Biochem Biotechnol, vol. 81, p.35-52. 1999.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D. *New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products*. Process Biochemistry, vol. 35, p. 1153-1169. 2000.
- Parques, F.W., Macedo, G.A. *Lipases de Látex Vegetais: Propriedades e Aplicações Industriais: A Review*. Química Nova, vol. 29, n. 1, p 93. 2006.
- Payne, G. *Enzymes in waste treatment and waste reduction*. Octavo Curso Avanzado sobre Procesos Biotecnológicos – Biotecnología Ambiental. Cuernavaca. México. 1997.
- Petruy, R., Lettinga, G. *Digestion of milk-fat emulsion*. Bioresource Technology, vol. 61, p. 141-149, 1997.
- Rahardjo, Y. S. P., Tramper, J., Rinzema, A. *Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives* Biotechnology Adv., vol. 24, p. 161-179, 2006.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y. , Petsas, I., Marchant, R., BANAT, I. M. *Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using 105 bacterial*



*consortium amended with rhamnolipid and micronutrients*. Bioresource Technology, vol. 90, nº 2, p. 159-168, 2003.

Rivera-Muñoz, G., Tinoco-Valencia, J. R., Sánchez, S. *et al.* *Production of microbial lipases in a solid state fermenter system*. Biotechnology Letters, vol. 13, nº 4, p. 277-280, 1991.

Rosa, D. R. *Tratamento enzimático/biológico de efluente com alto teor de gordura*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica/IQ/UFRJ, 2004, 106 p.

Rosa, D. R., Freire, D. M. G., Cammarota, M. C. *Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by Penicillium restrictum in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease*. Environmental Engineering Science, vol. 23, no 5, 814-823, 2006.

Rusten, B., Lundar, A., Eide, O., Odegaard, H. *Chemical pretreatment of dairy wastewater*. Water Science Technology, 28(2), p. 67-76. 1993.

Santa Anna, L. M, Sebastian G.V, Menezes, E.P, Alves, T.L.M, Santos, S, Pereira Jr, N., Freire, D.M.G. *Production of biosurfactants from Pseudomonas aeruginosa PA1 isolated in environments*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, vol. 19, p. 159-166, 2002.

Santa Anna, L. M. M., Soriano, A. U., Gomes, A. C., Menezes, E. P., Gutarra, M. L. E., Freire, D. M. G., Pereira JR, N. *Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 82, p. 687 – 691. 2007.

Sant'Anna Jr, G. L. *Tratamento Biológico de Efluentes: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro, RJ, Ed. Interciência, p. 418. 2010.

- Santos, B. C. P. *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. Rio de Janeiro. Brasil. 113pp. 2010.
- Santos, A. S., Sampaio, A. W., Vasquez, G. S. *et al.* *Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of Pseudomonas aeruginosa*. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol.100, nº 1-3, p. 1025-1036, 2002.
- Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., David-son, W.S., Bradoo, S., Gulati, R. *Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry*. Current Science, vol. 77, p.101-115. 1999.
- Sayed, S. K. I., van der Zanden, J., Wiljffels, R., Lettinga, G., *Anaerobic degradation of the various fractions of slaughterhouse wastewater*. Biology Wastes, vol. 23, p. 117-142, 1988.
- Schutyser, M.A.I., de Pagter, P., Weber, F.J., Briels, W.J., Boom, R.M., Rinzema, A. *Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed Solid-state fermentation with Aspergillus oryzae: Experiments and modeling*. Biotechnol Bioeng, vol. 83, p.503-513. 2003.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U. C. *Production, purification, characterization and applications of lipases*. Biotechnology Advances, v. 19, p. 627-662, 2001.
- Singh, A., Hamme, J. D. V., Ward, O. P. *Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Application aspects*. Biotechnology Advances, vol.25, nº 1, p. 99-121, 2007.

- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P.S. *Overview of applied solid-state fermentation in Brazil*. Biocheistrum Engineering Journal, vol. 13, p. 205-218. 2003.
- Sousa, J.S. *Estudo e Aplicação da Lipase de Pinhão Manso (Jatropha curcas L.) no Enriquecimento de Óleos Vegetais com Ácidos Graxos  $\omega$ -3*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Rio de Janeiro, Brasil, 102pp. 2010.
- Sousa, J.S., Cavalcanti-Oliveira, E. D., Aranda, D.A.G., Freire, D.M.G. *Application of lipase from the physic nut (Jatropha curcas L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 65, p. 133-137. 2010.
- Speece, R. E. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press, Nashville, USA, p. 394. 1996.
- Starkenbug, W. V. *Anaerobic treatment of wastewaters: State of the art*. Microbiology, 66(5), p. 588-596. 1997.
- te Biesebeke, R., Ruijter, G., Rahardjo, Y.S.P., Hoogschagen, M.J., Heerikhuisen, M., Levin, A., van Driel, K.G.A., Schutyser, M.A.I., Dijksterhuis, J., Zhu, Y., Weber, F.J., de Vos, W.M., van den Hondel, K.A.M.J.J, Rinzema, A., Punt, P.J. *Aspergillus oryzae in solid-state and submerged fermentation progress report on a multi-disciplinary project*. FEMS Yeast Research, vol. 2, p.245-248. 2002.
- Thomas, A., Allouche, M., Basyn, F., Brasseur, R., Kerfelec, B. *Role of lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity*. Journal Biological Chemistry, vol. 280, p. 40074- 40083. 2005.
- Treichel, H., Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., Oliveira, J. V. *A Review on Microbial Lipases Production*. Food Bioprocess Technology. 2009

- ul-Haq, I., Shumaila, I., Rajoka, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. vol. 37, p.637–641. 2002
- Valente, A. M. Aplicação de enzimas hidrolíticas no tratamento biológico anaeróbio de efluente de indústria de pescado. Tese de Doutorado. Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.
- Valladão, A. B. G., Freire, D. M. G., Cammarota, M. C. *Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol.60, p. 219 – 225. 2007.
- Valladão, A. B. G., Freire, D. M. G., Cammarota, M. C. *Evaluation of different pre-hydrolysis times and enzyme pool concentrations on the biodegradability of poultry slaughterhouse wastewater with a high fat content*. *Water Science & Technology Water Supply*, vol.60, p. 243 – 249. 2009.
- Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R. Lema, J. M. *Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters*. *Bioresource Technology*, vol.74, p. 231-239. 2000.
- Zhang, H., Mu, H., Xu, X. *Monitoring lipase catalyzed butterfat interesterification with rapessed oil by Fourier transform near-infrared spectroscopy*. *Anal Bioanal Chem*, vol. 386, p. 1889-1897. 2006.
- Zhang, H., Xiang, H., Zhang, G., Cao, X., Meng, Q. *Enhanced treatment of waste frying oil in an activated sludge system by addition of crude rhamnolipid solution*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 167, p. 217-223, 2009.