

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA – EST
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ANNE BORGES DE BASTOS

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE FÚNGICA NA DEGRADAÇÃO DO
EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA DE SORVETES

MANAUS

2019

ANNE BORGES DE BASTOS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE FÚNGICA NA DEGRADAÇÃO
DO EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA DE SORVETES**

**Monografia apresentada ao Curso de Graduação
em Engenharia Química da Escola Superior de
Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas,
para obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química.**

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque
Co-orientadora: Eng. Química Juliana Gisele Corrêa Rodrigues

MANAUS

2019

ANNE BORGES DE BASTOS

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE FÚNGICA NA DEGRADAÇÃO
DO EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA DE SORVETES**

**Monografia de Conclusão de Curso para obtenção do título de Engenheiro, Habilitação em
Engenharia Química – Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do
Amazonas**

Banca Examinadora:



Prof.ª Dr.ª Patrícia Melchionna Albuquerque – Orientadora



Ba. Gentil César Paixão – Heineken

Profa. Dra. Érica Simplicio de Souza– UEA

Conceito: Aprovada

Manaus, 06 de dezembro de 2019.

"No meio da confusão, encontre a simplicidade. A partir da discórdia, encontre a harmonia. No meio da dificuldade reside a oportunidade. "

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me acompanhar e pelas vitórias concedidas durante todo o período acadêmico.

Aos meus amados pais, Ana e Vanderlei, por todo o amor e apoio que foi dado durante essa jornada, não só acadêmica, mas na vida, ajudando-me a evoluir e a vencer os obstáculos.

Ao meu irmão Pedro, pelos conselhos e por despertar em mim o interesse pela engenharia.

A minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Albuquerque, por sua orientação e atenção no desenvolvimento do trabalho.

A minha co-orientadora, Juliana Rodrigues, por sempre estar disposta a me acompanhar e orientar sobre as análises, correções de trabalhos, auxiliar em todos os momentos de dificuldade e por incentivar sempre meu desenvolvimento acadêmico.

Aos discentes e docentes integrantes do Grupo de Pesquisa Química Aplicada à Tecnologia da UEA, por dividir seus conhecimentos e disponibilizar tempo e meios para uso das instalações laboratoriais.

A Profa. Dra. Cláudia Cândida, que me apresentou ao setor de pesquisa acadêmica, atuando como orientadora em dois projetos de pesquisa.

Aos meus amigos de longa data, Kennedy e Paulo André, pelas brincadeiras, conversas, apoio, confiança e estímulo. O fato de ter vocês ao meu lado por tanto tempo me deu forças para seguir em frente.

Aos meus amigos da Universidade do Estado do Amazonas, em especial Allan Everton, Letícia Sako e Ricardo Gil, pela amizade que espero levar para a vida; pelos momentos de descontração; e pelos conhecimentos compartilhados que muito me ajudaram e tornaram a conclusão do curso mais fácil. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao meu gestor, Gentil César Paixão, pela oportunidade de trabalho e confiança em mim depositada. Isso exerceu um papel importante tanto no meu desenvolvimento profissional quanto pessoal.

Aos meus colegas de trabalho da Heineken, em especial Justo Neto, Gelciara Gomes, Priscila Flores e Irineu dos Anjos, pela amizade, ensinamentos, conselhos e suporte.

RESUMO

Indústrias de diferentes setores produzem efluentes em seus processos produtivos. Dependendo da atividade, as características dos resíduos produzidos variam consideravelmente. No caso da indústria sorveteira, esta apresenta efluentes de elevada carga orgânica proveniente, principalmente, do leite que é sua principal matéria-prima, refletindo, assim, em um resíduo com elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO), óleos e graxas. Porém, o acúmulo de gorduras no sistema afeta a eficiência do tratamento do efluente gerado. Como forma de eliminar tais dificuldades, estuda-se a utilização de biocatalisadores como enzimas, em especial as lipases, que atuam na hidrólise de óleos e gorduras reduzindo, assim, a quantidade de lipídeos nos efluentes. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo produzir e aplicar uma lipase fúngica para degradação do efluente de uma indústria de sorvetes. Lipase do fungo endofítico *Talaromyces sp.*, isolado de um hospedeiro amazônico, foi produzida em cultivo submerso e utilizada na degradação do efluente. A enzima foi produzida em Erlenmeyers com 100 mL de meio contendo azeite de oliva (1%) e pH 6. A atividade lipolítica máxima obtida foi de $3,192 \pm 0,029$ U/mL, após 144 h de cultivo. Este extrato enzimático foi aplicado diretamente no efluente autoclavado e no efluente bruto (sem autoclavagem), sendo a eficácia da hidrólise da gordura avaliada com base no índice de acidez (I.A) e na DQO. Verificou-se diminuição da DQO e aumento do I.A depois de 4 h. O tratamento enzimático com o efluente na forma bruta foi estudado utilizando-se um delineamento fatorial completo, com duas variáveis (pH e concentração enzimática) e dois níveis (pH = 3,5 e 7,0; concentração enzimática = 12,8 e 25,5 U/mL), durante 4 h. Os experimentos foram feitos avaliando-se a remoção de DQO e o aumento no I.A. Através dos gráficos de Pareto ($p < 0,05$), verificou-se a influência estatisticamente significativa do pH sobre o I.A. Utilizando pH 7,0 e 12,8 U/mL de lipase foi possível obter os melhores resultados de degradação do efluente (88,46% de remoção de DQO e 22,22% de aumento no I.A.). O teor de óleos e gorduras (TOG) foi determinado tanto no efluente bruto, quanto naqueles experimentos realizados em pH 7,0, nas duas concentrações enzimáticas. A redução do TOG foi de 88,72% (com 12,8 U/mL) e de 94,50% (com 25,5 U/mL). Os resultados deste trabalho, além de mostrarem as variáveis que interferem na degradação de efluentes da indústria de sorvete, justificam a continuação de estudos de tratamento de efluentes com elevado teor lipídico, por meio da aplicação de lipase fúngica.

Palavras-chave: tratamento, efluentes, lipase.

ABSTRACT

Different types of industries generates effluents in their processes. Depending on the activity, the characteristics of the wastewater produced vary considerably. The ice cream industry has high organic load wastewater from milk, which is its main raw material, reflecting in a residue with high Chemical Oxygen Demand (COD) and high content of oils and greases. However, the accumulation of fats in the system affects the efficiency of treatment of the generated effluent. In a way to eliminate such difficulties, the use of biocatalysts as enzymes is studied, especially lipases, which act in the hydrolysis of oils and fats, thus reducing the amount of lipids in the effluents. Thus, the present study aimed to produce and apply a fungal lipase for effluent degradation of an ice cream industry. Lipase of the endophytic fungus *Talaromyces* sp., Isolated from an Amazonian host, was produced in submerged cultivation and used for effluent degradation. The enzyme was produced in Erlenmeyers with 100 mL medium containing 1% olive oil and pH 6. The maximum lipolytic activity obtained was 3.192 ± 0.029 U / mL after 144 h of cultivation. This enzymatic extract was applied directly to the autoclaved effluent and the raw effluent (without autoclaving). The effectiveness of fat hydrolysis was evaluated based on the acidity index (A.I) and COD. There was a decrease in COD and an increase in A.I after 4 h. Enzymatic treatment with raw effluent was studied using a complete factorial design with two variables (pH and enzymatic concentration) and two levels (pH = 3.5 and 7.0; enzymatic concentration = 12.8 and 25.50 U/ml) for 4 h. The experiments were performed by evaluating COD removal and increase in A.I. Through Pareto graphs ($p < 0.05$) was verified the statistic influence of pH on the A.I. Using pH 7.0 and 12.8 U/mL lipase, it was possible to obtain the best effluent degradation results (88.46% COD removal and 22.22 % increase in A.I.). The oil and fat content (TOG) was determined both in the raw effluent and in those experiments performed at pH 7.0, in both enzymatic concentrations. The TOG reduction was 88.72 % (with 12.8 U / mL) and 94.50 % (with 25.5 U/mL). The results of this work, besides showing the variables that interfere with the effluent degradation of the ice cream industry, justify the studies of high lipid effluent treatment through the application of fungal lipase.

Keywords: treatment, wastewater, lipase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de fabricação do sorvete.....	13
Figura 2 - Etapas do tratamento físico-químico de efluentes.	17
Figura 3 - Caixa de gordura utilizada no tratamento de efluentes da indústria de laticínios.....	18
Figura 4 - Esquema do processo de decantação e filtração.	19
Figura 5 - Esquema de um sistema de lodos ativados.	20
Figura 6 - Representação esquemática de um reator tipo UASB.	21
Figura 7 - Representação esquemática das reações de transesterificação catalisadas por lipase. .	27
Figura 8 - Fungo <i>Talaromyces</i> sp., isolado da folha de vassourinha (<i>Myrcia guianensis</i>).	30
Figura 9 - Curva de calibração para determinação da DQO.....	32
Figura 10 - Atividade lipolítica do meio de cultivo do fungo <i>Talaromyces</i> sp.	40
Figura 11 - Variação da DQO do efluente bruto (● –) e do efluente autoclavado (■ –) durante o tratamento enzimático utilizando extrato lipolítico de <i>Talaromyces</i> sp.	42
Figura 12 - Variação do índice de acidez do efluente bruto (● –) e do efluente autoclavado (■ –) durante o tratamento enzimático utilizando extrato lipolítico de <i>Talaromyces</i> sp.	43
Figura 13 - Variação da DQO durante o tratamento enzimático do efluente de uma indústria de sorvetes.	44
Figura 14 - Variação do índice de acidez durante o tratamento do efluente de uma indústria de sorvetes.	46
Figura 15 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados tendo como resposta o índice de acidez do efluente de uma indústria de sorvetes, após tratamento enzimático.....	48
Figura 16 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados tendo como resposta a DQO do efluente de uma indústria de sorvetes, após tratamento enzimático.....	49
Figura 17 - Gráfico de interação entre o pH e a concentração enzimática para a DQO.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de lançamento de efluentes em corpos hídricos.	17
Tabela 2 - Comparação entre os tratamentos industriais aeróbico e anaeróbico.	22
Tabela 3 - Classificação das enzimas.	24
Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^3	37
Tabela 5 - Caracterização do efluente produzido pela Indústria de sorvetes e após passagem pela Estação de Tratamento de Resíduos Industriais (ETDI).	38
Tabela 6 - Atividade enzimática de lipase produzida pelo fungo <i>Talaromyces</i> sp.	40
Tabela 7 - Valores de DQO e de índice de acidez do efluente de uma indústria de sorvetes tratado com o extrato lipolítico de <i>Talaromyces</i> sp., obtidos a partir de um planejamento experimental fatorial completo 2^3 , avaliando o efeito do pH e da concentração enzimática.	47
Tabela 8 - Teor de óleos e gorduras nas amostras de efluente de uma indústria de sorvetes, bruto e tratado enzimaticamente.	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABIS	Associação Brasileira de Indústrias de Sorvetes
ABS	Absorbância
AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
BDA	Ágar Batata Dextrose
CIS	Companhia Ituana de Saneamento
COMDEMA	Conselho Municipal de Desenvolvimento e Meio Ambiente
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FES	Fermentação em Estado Sólido
I.A	Índice de Acidez
IUB	União Internacional de Bioquímica
OD	Oxigênio Dissolvido
pNPP	Palmitato de p-Nitrofenila
ppm	Parte por milhão
QAT	Química Aplicada à Tecnologia
rpm	Rotação por minuto
SANEP	Serviço Autônomo de Saneamento de Pelotas
SST	Sólidos Suspensos Totais
ST	Sólidos Totais
TOG	Teor de Óleos e Graxas
U	Unidade
UASB	Reator de Leito de Lodo Anaeróbio de Fluxo Ascendente
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
UNT	Unidades Nefelométricas de Turbidez.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO SORVETE.....	13
2.2 EFLUENTES LÍQUIDOS DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS.....	15
2.2.1 Características do Efluente da Indústria de Laticínios.....	15
2.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS.....	16
2.3.1 Tratamento Físico-Químico.....	17
2.3.2 Tratamento Biológico	19
2.3.3 Problemas Quanto ao Tratamento Biológico de Efluentes com Alto Teor de Lipídeos.....	22
2.4 USO DE ENZIMAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES.....	23
2.5 LIPASES	25
2.5.1 Fontes e Produção de Lipases.....	26
2.5.2 Reações Catalisadas por Lipases.....	27
2.5.3 Fatores que Interferem no Processo de Hidrólise Enzimática de Lipídeos	28
2.5.4 Aplicação de Lipases em Tratamento de Efluentes Ricos em Lipídeos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 MICRORGANISMO.....	30
3.2 EFLUENTE	31
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	31
3.3.1 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	31
3.3.2 Determinação dos Sólidos Totais (ST).....	32
3.3.3 Determinação dos Sólidos Suspensos Totais (SST)	33
3.3.4 Determinação dos Sólidos Sedimentáveis.....	33
3.3.5 Determinação do pH.....	34
3.3.6 Determinação da Temperatura	34
3.3.7 Determinação da Turbidez	34
3.3.8 Determinação da Concentração de Óleos e Graxas	34
3.3.9 Determinação do Índice de Acidez.....	35
3.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM MEIO LÍQUIDO	35

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	36
3.6 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO EFLUENTE	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	38
4.2 PRODUÇÃO DE LIPASE	39
4.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO.....	42
4.3.1 Determinação do Tempo de Tratamento e do Tipo de Efluente	42
4.3.2 Tratamento com Efluente Bruto	44
4.4 ESTUDO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM O TRATAMENTO ENZIMÁTICO..	46
5 CONCLUSÕES.....	52
6 PERSPECTIVAS.....	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A indústria sorveteira, um exemplo de indústria de laticínios, apresenta um grande volume de efluentes proveniente, principalmente, de operações de limpeza de equipamentos e que apresentam elevada carga orgânica. Esta carga orgânica é constituída basicamente de leite (tanto matéria-prima quanto seus derivados), refletindo em um resíduo com elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), óleos e graxas, nitrogênio e fósforo. (MARQUARDT et al., 2012)

O tratamento do efluente gerado nesse tipo de indústria pode ser feito através de tratamentos físico-químicos, que apresentam um custo maior devido ao uso de reagentes; e de tratamentos biológicos que são menos dispendiosos, pois empregam a ação metabólica de microrganismos que estabilizam o material orgânico (MENDES, 2005). Porém, certos fatores podem atrapalhar o bom desempenho dos sistemas de tratamento, como o alto teor de óleos e graxas. O acúmulo de gorduras no sistema, além de reduzir a transferência de oxigênio para o meio em sistemas aeróbios, também reduz a taxa de absorção de substratos para a biomassa, o que diminui a conversão da matéria orgânica. (PEREIRA et al., 2004)

Na busca por meios que eliminem tais dificuldades, estudos voltados para processos alternativos de tratamento de efluentes gordurosos estão em desenvolvimento. Dentre eles, a utilização de biocatalisadores como enzimas, em especial as lipases, recebem destaque. As lipases são compostos que atuam na hidrólise de óleos e gorduras reduzindo, assim, a quantidade de lipídeos nos efluentes. Provenientes de animais, de vegetais ou de microrganismos, as lipases que vêm recebendo maior destaque são as provenientes de fungos, pois são produzidas de forma extracelular, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo. (COLLA et al., 2012; SHARMA et al., 2014)

O pré-tratamento enzimático permite que os microrganismos atuem de forma mais eficaz no efluente, reduzindo o tempo de retenção hidráulica, o volume dos reatores, e consequentemente, o custo do processo. (VALENTE et al., 2010)

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo geral produzir e aplicar uma lipase fúngica no tratamento de efluente com elevado teor de gordura, proveniente de uma indústria de sorvetes. E os objetivos específicos são:

- Realizar a caracterização do efluente obtido de uma indústria de sorvetes;

- Produzir lipase fúngica em cultivo submerso;
- Utilizar o extrato enzimático bruto na degradação do efluente da indústria de sorvetes;
- Avaliar a influência da concentração de lipase e do pH do meio durante a degradação do efluente;
- Avaliar a eficiência do tratamento enzimático sobre o efluente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DO SORVETE

Dentre os derivados lácteos, o sorvete é um produto muito consumido e apreciado mundialmente. Estima-se que a indústria de sorvetes movimente US\$ 73,8 bilhões em vendas mundialmente, com uma perspectiva de crescimento em torno de 10% ao ano em países como o Brasil. Segundo a Associação Brasileira de Indústrias de Sorvetes (ABIS), o consumo per capita em 2017 esteve na faixa de 5,44 litros de sorvete/ano por habitante. (ABIS, 2019) Porém, é uma média relativamente baixa quando comparada a alguns países, como os Estados Unidos, com 22,5; Canadá, com 17,80; Austrália, com 17,80; e Itália, com 8,20 litros de sorvete/ano por habitante. (GOFF et al., 2013)

O sorvete é um produto de composição bastante variada, normalmente apresentando de 8 a 20% de gordura, 8 a 15% de sólidos não gordurosos do leite, 13 a 20% de açúcar e 0 a 0,7% de emulsificante-estabilizante, podendo haver variabilidade de acordo com a região e em diferentes mercados. (SOUZA et al., 2010) É um produto complexo, que contém muitos ingredientes em distintos estados. A gordura apresenta-se na forma de emulsão; proteína, estabilizantes e açúcares insolúveis apresentam-se na forma de suspensão coloidal, e a lactose e sais em forma de dissolução. A água se encontra no estado líquido como solvente de sais e açúcares, e na forma sólida como cristais de gelo. (SOUZA et al., 2010)

Todos os ingredientes apresentam papel fundamental nas características do produto, sendo que a gordura do leite representa o ingrediente mais importante na qualidade do sorvete e o primeiro a ser estimado na composição do produto. Os demais ingredientes são estabelecidos com base na proporção em que se ligam à gordura. Esta é responsável por fornecer energia e interagir com outros ingredientes desenvolvendo o sabor e a textura. (QUEIROZ et al., 2009)

A fabricação do sorvete pode ser dividida em etapas, agrupadas em quatro estágios fundamentais, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Etapas de fabricação do sorvete.



Fonte: Própria (2019).

Cada etapa varia de acordo com a técnica escolhida sendo, em geral, descritas da seguinte forma: (SANTOS, 2009)

1. Mistura e pasteurização: processo no qual os ingredientes líquidos são colocados no equipamento de pasteurização para agitação e aquecimento com o intuito de liquefazer a gordura, dissolver a sacarose e o estabilizante; além de eliminar ou reduzir os microrganismos que possam contaminar o produto. Os ingredientes secos são misturados entre si previamente, para evitar a formação de grumos e adicionados em seguida à mistura no pasteurizador;
2. Homogeneização da mistura: etapa que tem como objetivo reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura da emulsão;
3. Maturação da calda homogeneizada: etapa onde são adicionados aromatizantes, polpas de frutas e emulsificantes, tendo por objetivo produzir mudanças desejáveis nos aspectos sensoriais do sorvete, tais como a solidificação da gordura, resistência ao derretimento e melhora da textura e capacidade de incorporação de ar;
4. Batimento da calda e congelamento: processo onde ocorre a incorporação de ar, formação de cristais, que conferem o aspecto cremoso, e aparecimento de uma fase não congelada que se deposita sobre os cristais de gelo, assim aumentando seu tamanho.

2.2 EFLUENTES LÍQUIDOS DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

A indústria de laticínios gera cerca de 0,2 a 10 litros de efluente por litro de leite processado, sendo o volume de água consumido e de efluente gerado variáveis dependentes do tipo de processo utilizado, dos produtos produzidos, da qualidade da água requerida e das práticas de gestão aplicadas. (VOURCH et al., 2008)

Em geral, os efluentes são gerados em operações de lavagem e limpeza, descarga e descartes, vazamentos e derramamentos. As operações de lavagem e limpeza dos tanques, pasteurizadores, homogeneizadores e tubulações consistem em sete etapas: enxágue, circulação com hidróxido de sódio, enxágue, circulação ácida, enxágue, sanitização e enxágue final. A lavagem com hidróxido de sódio (0,2 a 2,0%) remove proteínas e gorduras, enquanto a lavagem ácida com ácido nítrico (0,5%) e fosfórico (2%) remove depósitos inorgânicos. Os efluentes desse processo correspondem de 50 a 95% do volume total de efluentes gerados. (ANDRADE, 2011; MARQUARDT et al., 2012)

Em termos de carga orgânica, fatores como derrames devido a falhas de operação ou equipamentos em manutenção, quebra de embalagens com o produto, perdas no processo durante a operação de equipamentos e lubrificação de transportadores são contribuintes significativos para a carga poluidora do resíduo final. (MAGANHA, 2006)

2.2.1 Características do Efluente da Indústria de Laticínios

Os efluentes gerados pelas indústrias de laticínios são compostos por leite e derivados diluídos, detergentes e desinfetantes, lubrificantes de máquinas e esgoto doméstico, se caracterizando pelos altos teores de matéria orgânica, entre outros elementos. (ANDRADE, 2011)

A elevada carga orgânica reflete um efluente com grande Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). A DQO mede o consumo de oxigênio que ocorre durante a oxidação química da matéria orgânica. É o parâmetro mais utilizado para avaliação da poluição, pois tem intensa relação com a DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), que é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica bioquimicamente. Este último pode indicar a perda de produto durante o processo e ainda ser o principal indicador da eficiência dos processos de tratamento. (VILELA, 2012)

Não existem muitas publicações sobre a composição desses efluentes, mas sabe-se que eles são compostos principalmente por proteínas; carboidratos, principalmente lactose; gorduras, sólidos suspensos, nitrogênio e fósforo. (BRITZ et al., 2006) Os sólidos suspensos são derivados de coágulos de leite, que correspondem a 90% da quantidade de gorduras totais do efluente. A presença de nitrogênio está relacionada com a alta concentração de proteínas, enquanto o fósforo é proveniente do uso de ácido fosfórico e detergentes na lavagem de instalações. A lactose e as proteínas são consideradas facilmente biodegradáveis, porém a degradação das gorduras é mais lenta, e pode ser considerada um fator limitante nos tratamentos biológicos. (ANDRADE, 2011)

Além disso, dependendo da linha produtiva e disponibilidade de insumos, o efluente pode conter ainda pedaços de frutas, essências, condimentos diversos e subprodutos como o soro. Dessa forma, percebe-se que as características físico-químicas do resíduo gerado são variáveis, sendo de grande importância conhecer suas características e assim realizar o tratamento adequado. (KARADAG et al., 2014)

2.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS

A natureza altamente variável dos efluentes de laticínios torna difícil a escolha de um regime eficaz de tratamento de águas residuais. (BRITZ et al., 2006) Geralmente, o tratamento convencional é formado por quatro etapas. A primeira é um pré-tratamento para a retirada de resíduos grosseiros; seguida de um tratamento primário para remoção de sólidos, óleos e gorduras presentes; tem-se então um tratamento secundário para remoção de matéria orgânica e nutrientes (nitrogênio e fósforo) e, em certas situações, tratamento terciário para polimento final do resíduo tratado (AL-SHAMMARI et al., 2015). Todas essas etapas são formadas pela combinação de métodos físicos, químicos e biológicos com o objetivo de adequar o efluente aos padrões de despejo definidos, garantindo a preservação do meio segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 357 de 2005.

Já no âmbito municipal, a cidade de Manaus conta com a resolução do Conselho Municipal de Desenvolvimento e Meio Ambiente (COMDEMA) nº 034 de 2012 definindo as condições e padrões de lançamento de efluentes líquidos industriais. A Tabela 1 a seguir, apresenta alguns padrões para o lançamento de efluentes líquidos em corpos receptores, descritos pelo CONAMA e pelo COMDEMA.

Tabela 1 - Parâmetros de lançamento de efluentes em corpos hídricos.

Parâmetros	CONAMA Nº 357/2015	COMDEMA Nº 34/2012
pH	Entre 5 e 9	Entre 6 e 9
Temperatura (°C)	Menor que 40	Menor que 40
Sólidos totais (mg/L)	-	-
Sólidos sedimentáveis (mL/L)	Até 1	Até 1
Sólidos em suspensão (mg/L)	500	100
Óleos e graxas minerais (mg/L)	Até 20	Até 20
Óleos e graxas animais (mg/L)	Até 50	Até 50
DBO (mg/L)	Até 10	Máximo de 60
DQO (mg/L)	-	Máximo de 100

2.3.1 Tratamento Físico-Químico

Antes do início do tratamento, faz-se necessário a retirada de resíduos, como porções de embalagens, pequenos fragmentos de pedras e coágulos de leite considerados como sólidos grosseiros que possam danificar os dispositivos de transporte dos esgotos (bombas e tubulações) e prejudicar os processos de tratamento subsequentes. A remoção é feita frequentemente por meio de grades, mas pode-se usar também peneiras rotativas ou trituradores. (METCALF et al., 2015).

Segue-se então para o início do tratamento que consiste nos processos de coagulação/floculação, decantação e filtração, conforme dispostos na Figura 2. (BRITZ et al., 2006)

Figura 2 - Etapas do tratamento físico-químico de efluentes.

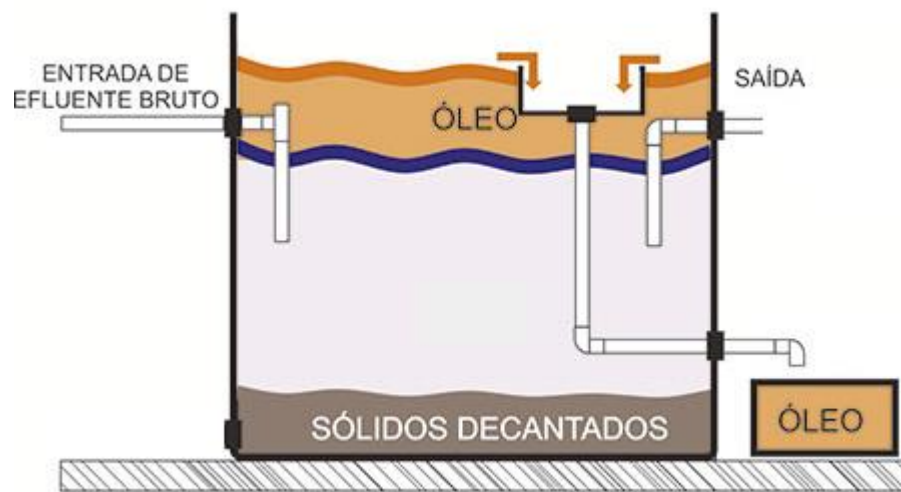


Fonte: Adaptada de SERVIÇO AUTÔNOMO DE SANEAMENTO DE PELOTAS (SANEP) (2019).

A coagulação química ocorre através da utilização de agentes coagulantes (sais de alumínio e ferro) que são responsáveis por neutralizar as cargas negativas das partículas e modificar as características da água e dos sólidos, induzindo a aproximação das partículas dispersas e garantindo a formação de flocos. No caso de efluentes emulsionados, o processo ocorre através da desestabilização do estado coloidal da emulsão, neutralizando as forças eletrostáticas e/ou as forças de Van der Waals. (SPERLING, 2014)

Após a coagulação ocorre o processo de floculação com a junção dos flocos que ficam dispersos na água e, posteriormente, são sedimentados. Nas indústrias de laticínios, empregam-se ainda caixas de gordura, ilustradas na Figura 3, para reter os sólidos que a floculação não consegue retirar. (MENDES et al., 2005)

Figura 3 - Caixa de gordura utilizada no tratamento de efluentes da indústria de laticínios.



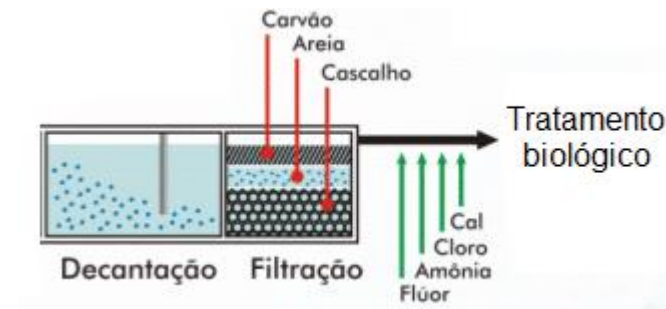
Fonte: NATURALTEC (2019).

O processo é feito por diferença de densidades, em que as frações oleosas menos densas são recolhidas na superfície. Na entrada da caixa faz-se necessário manter o pH abaixo de 8,5 e a temperatura inferior a 35 °C evitando a saponificação ou emulsificação, uma vez que o excesso de detergentes prejudica a eficiência de separação com a formação de gotículas de gordura de menor tamanho. (MENDES et al., 2005)

As partículas sólidas em suspensão no efluente podem ser removidas em unidades de decantação, sendo uma parte destes sólidos a matéria orgânica em suspensão. A fase líquida (efluente tratado) é separado da porção sedimentada (lodo) na parte inferior que deve ser removido

periodicamente, necessitando de uma filtração final para retirar partículas finas em suspensão, e um tratamento químico ou biológico posterior que visa reduzir a quantidade de elementos não desejados, bem como levar para os limites aceitáveis os níveis de DBO e a presença de microrganismos, para que se despeje o efluente. A Figura 4 representa um esquema do processo de decantação e filtração. (SPERLING, 2014)

Figura 4 - Esquema do processo de decantação e filtração.



Fonte: COMPANHIA ITUANA DE SANEAMENTO (CIS) (2019).

Os processos físico-químicos permitem uma remoção parcial de sólidos totais com o emprego de reagentes químicos, mas estes apresentam custos elevados e podem induzir uma poluição secundária com o uso de aditivos químicos. Além disso, a remoção de sólidos dissolvidos é bastante reduzida, sendo esta realizada geralmente por processos biológicos. (TCHAMANGO et al., 2010)

2.3.2 Tratamento Biológico

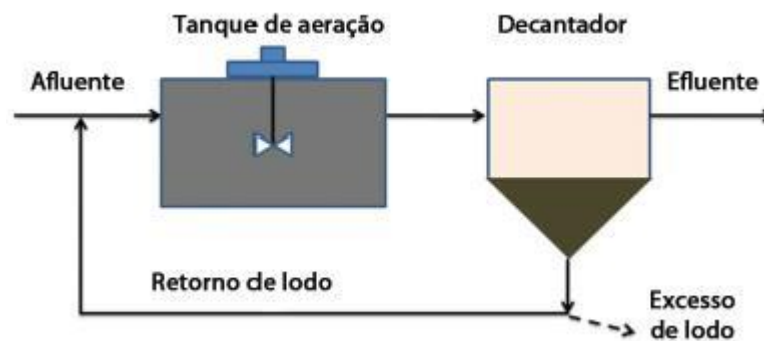
O tratamento biológico tem como um dos objetivos a remoção da matéria-orgânica (carboidratos, proteínas e lipídeos) do efluente através de reações bioquímicas realizadas por microrganismos. Estes convertem a matéria orgânica em gás carbônico, água e material celular. Essa decomposição biológica do material orgânico requer a manutenção de condições ambientais favoráveis como temperatura, pH e concentração, além da presença e ausência de oxigênio no meio, classificando o processo como aeróbio e anaeróbio, respectivamente. (METCALF et al., 2015)

Nos processos aeróbios a estabilização dos despejos é realizada por microrganismos, geralmente bactérias, aeróbias e facultativas. As bactérias responsáveis por este processo de

eliminação da matéria orgânica atuam com maior eficiência em condições adequadas de temperatura na faixa de 20 a 30 °C e pH entre 6,0 a 8,0, evitando a formação de fungos e má sedimentação de lodo. (SILVA, 2016)

Os reatores aeróbios utilizados podem ser: filtro biológico, lagoa de estabilização aerada e lodos ativados, sendo este último o mais empregado. Em sistemas de lodos ativados, conforme ilustrado na Figura 5, a concentração de biomassa no reator é bastante elevada, devido à recirculação de bactérias sedimentadas no fundo do decantador. Este é o princípio básico do sistema de lodos ativados, em que parte das bactérias presentes na unidade de decantação são retornadas à unidade de aeração. A biomassa permanece mais tempo no sistema do que o líquido, o que garante uma elevada eficiência na remoção da DBO. (METCALF et al., 2015)

Figura 5 - Esquema de um sistema de lodos ativados.



Fonte: MARTINS (2014).

Já os processos anaeróbicos são realizados por bactérias que não necessitam de oxigênio para transformar a matéria orgânica em estruturas moleculares menores. Estes processos ocorrem por meio de quatro etapas (ALBERTON, 2009):

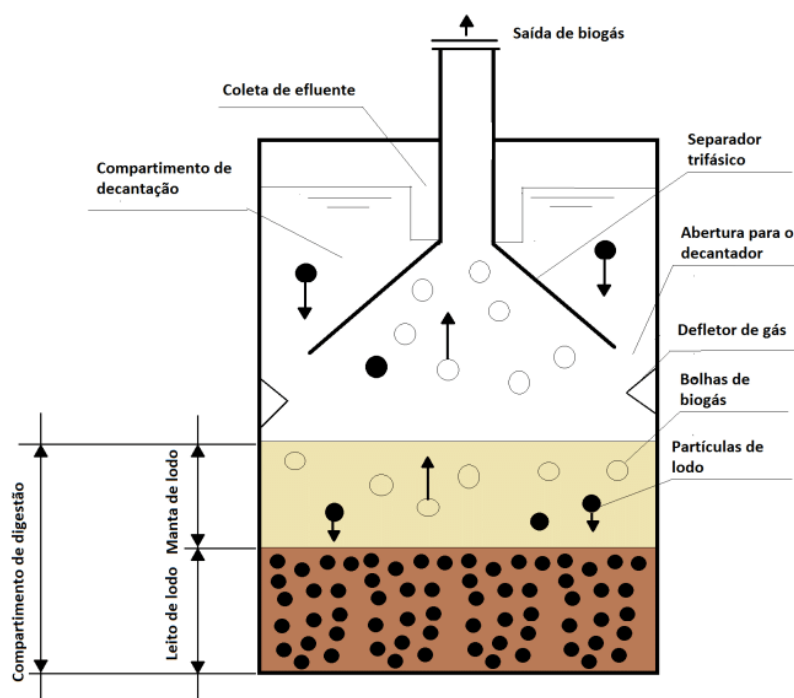
1. Hidrólise: conversão do material orgânico complexo em compostos de menor cadeia através de enzimas extracelulares (lipases, proteases, amilases) produzidas por bactérias fermentativas;
2. Acidogênese: os compostos gerados na hidrólise são absorvidos por bactérias fermentativas e eliminados como ácidos graxos voláteis (AGV), álcoois, ácido lático e compostos minerais, como dióxido de carbono (CO_2), gás hidrogênio (H_2), amoníaco (NH_3) e sulfeto de hidrogênio (H_2S);

3. Acetogênese: conversão dos produtos da acidogênese em acetato, H_2 e CO_2 pelas bactérias acetogênicas facultativas e anaeróbias obrigatórias;
4. Metanogênese: produtos da etapa anterior convertidos em substâncias finais mais simples, como metano (CH_4) e CO_2 .

Dentre os diversos tipos de tratamentos anaeróbios utilizados, o reator de leito de lodo anaeróbio de fluxo ascendente (UASB), representado na Figura 6, é o mais utilizado industrialmente no Brasil. Estes reatores são formados por um tanque em que na parte inferior está localizada a zona de digestão e na parte superior tem-se a zona de decantação e separação do gás. O efluente encontra-se disperso na base do reator e passa por meio da camada de lodo biológico, sendo submetido às quatro etapas de transformação, descritas anteriormente, e produzindo principalmente metano e gás carbônico. (MENDES et al., 2005)

A Tabela 2 apresenta algumas vantagens e desvantagens quanto ao uso desses dois tipos de tratamentos. Apesar das vantagens do tratamento biológico aeróbico, a alta exigência de energia é a sua principal desvantagem. A ausência de aeração e a baixa demanda de área de instalação são vantagens adicionais dos processos de tratamento anaeróbico, em comparação com os processos aeróbicos. (SHETE et al., 2013)

Figura 6 - Representação esquemática de um reator tipo UASB.



Fonte: BARROS (2016).

Tabela 2 - Comparação entre os tratamentos industriais aeróbico e anaeróbico.

Fatores	Processo aeróbico	Processo anaeróbico
Reator	Lodos ativados	UASB
Tamanho	Requer áreas extensas	Áreas menores
Qualidade do efluente	Excelente qualidade do efluente em termos de remoção de DQO, DBO e nutrientes é alcançada.	DQO é aceitável, porém necessário tratamentos posteriores. Remoção de nutrientes é insuficiente.
Energia	Alta energia é requerida	Produção de CH ₄ como fonte de energia
Rendimento de biomassa	Produz 6-8 vezes mais do que o anaeróbico	Menor quantidade produzida

Fonte: SHETE et al. (2013).

2.3.3 Problemas Quanto ao Tratamento Biológico de Efluentes com Alto Teor de Lipídeos

Os sistemas de tratamento de efluentes geralmente são combinações de diferentes tipos de processos, sejam eles físicos, químicos ou biológicos. Em efluentes, os lipídeos que não são retidos no processo anterior ao tratamento biológico podem se tornar um problema considerável, prejudicando as demais etapas. (CAMMAROTA et al., 2006)

Os lipídeos são encontrados principalmente como triglicerídeos e uma pequena parte como ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). Os efluentes contendo uma alta concentração de triglicerídeos devem ter essas moléculas hidrolisadas e, posteriormente, transformadas em fonte de carbono para as bactérias durante o tratamento biológico. (MENDES, 2005)

Nos reatores aeróbicos, a presença excessiva de lipídeos bloqueia a transferência de oxigênio necessário para a degradação biológica. Especificamente, eles reduzem as taxas de transferência de substratos para a biomassa pela adsorção de gorduras à superfície do lodo, diminuindo a taxa de conversão desses substratos. Os lipídeos também causam problemas no bombeamento e sistemas de aeração que surgem devido ao desenvolvimento de espuma. Esta consiste em materiais flutuantes compostos por graxa, óleos, gorduras, na superfície do tanque de aeração que dificultam a entrada de oxigênio. (VALENTE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014)

Nos reatores anaeróbicos, a hidrólise de lipídeos é uma etapa limitante na digestão devido ao baixo consumo de ácidos graxos de cadeia longa pelas bactérias e à necessidade de uma pequena concentração de hidrogênio (H_2), formado nas reações de encurtamento da cadeia carbônica dos AGCL. O acúmulo deste gás pode afetar o equilíbrio das reações de decomposição dos AGCL que são termodinamicamente desfavoráveis. Dessa forma, a alta concentração de AGCL pode exercer efeitos tóxicos e inibir bactérias anaeróbicas. (CAMMAROTA et al., 2006)

Visto os problemas que elevados teores de lipídeos causam no tratamento biológico, processos alternativos têm sido utilizados para reduzir a concentração de gorduras nos efluentes. Como exemplo, tem-se o tratamento enzimático que consiste em realizar um pré-tratamento no efluente, diminuindo o teor de óleos e gorduras, facilitando a ação microbiana durante o tratamento biológico. (VALENTE et al., 2010)

2.4 USO DE ENZIMAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, formadas por uma parte proteica, mas podem estar ligadas a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. (SOUZA et al., 2009) Em geral, as enzimas são catalisadores altamente específicos e extremamente eficientes. Elas podem seletivamente degradar um composto sem afetar os outros componentes do efluente. Portanto, o tratamento enzimático é aplicável para efluentes com diferentes concentrações de poluentes. (MUGDHA et al., 2012)

Além disso, as enzimas superam os catalisadores regulares (com elementos como cobre e níquel), pois operam em condições menos rigorosas de pH e temperatura e, do ponto de vista ambiental, são mais aceitáveis devido à sua biodegradabilidade. (MUGDHA et al., 2012)

Devido aos grandes avanços no isolamento e identificação de novas enzimas, a União Internacional de Bioquímica (IUB) estabeleceu critérios para a nomenclatura e a classificação das enzimas. A Tabela 3 mostra as seis classes em que as enzimas foram divididas de acordo com o tipo de reações que catalisam.

Tabela 3 - Classificação das enzimas.

Classe	Reações que catalisam	Exemplos
Oxirredutases	Reações de transferência de elétrons (oxi-redução).	Desidrogenases, redutases e oxidases.
Transferases	Reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc.	Quinases e transaminases.
Hidrolases	Reações de hidrólise de ligação covalente.	Proteases, glucanases e lipases.
Liasas	Quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.	Dehidratases e descarboxilases.
Isomerase	Reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos.	Epimerases.
Ligases	Reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre às custas de energia (ATP).	Sintetases.

Fonte: MONTEIRO et al. (2009).

Atualmente são conhecidas mais de 4000 enzimas, sendo em torno de 200 delas destinadas para uso comercial e produzidas por microrganismos. Cerca de 75% das enzimas industriais são hidrolases e desse conjunto, 90% são produzidas através de processos fermentativos. Pertencentes ao grupo das hidrolases, as proteases, responsáveis pela hidrólise das proteínas; e as glucanases, que hidrolisam os carboidratos, são as mais utilizadas no mercado atual. As lipases, por sua vez, formam o terceiro maior grupo em vendas mundialmente. (MESSIAS et al., 2011)

Entre várias possibilidades, os biocatalisadores podem ser usados no tratamento de efluentes gerados nas indústrias petrolífera, têxtil, papel, derivados de celulose e alimentícias em geral. A indústria petrolífera produz efluentes contendo poluentes, como fenóis que são tóxicos ao ambiente e potencialmente nocivos à saúde humana. Além disso, apresentam alta solubilidade, sendo muitos de seus derivados considerados poluentes perigosos. A aplicação do tratamento enzimático no efluente gerado por essa indústria consiste na transformação dos fenóis em substâncias menos solúveis em água. Uma enzima muito empregada é a tirosinase, uma polifenol oxidase presente em vários seres vivos, principalmente no cogumelo *Agaricus bisporus*. Esta

enzima é capaz de catalisar a oxidação de fenóis utilizando apenas o oxigênio molecular como oxidante. (MACHADO et al., 2018)

A indústria de papel e celulose, por sua vez, é caracterizada pela geração de efluentes líquidos com altas concentrações de matéria orgânica, cor, compostos de desregulação endócrina e compostos fenólicos de alto peso molecular, que se lançados sem o devido tratamento, causam impacto significativo no meio ambiente. Um grupo de enzimas que são empregados no setor é o das lacases. Estas são utilizadas, entre outras aplicações, no tratamento de efluentes pelo seu potencial de catalisar as reações de oxidação de poluentes fenólicos. (MACHADO et al., 2018)

Já a indústria têxtil produz efluentes com alta concentração de álcalis, carboidratos, proteínas e corantes contendo metais pesados. Em grandes concentrações, os materiais pesados são tóxicos, fazendo com que os microrganismos reduzam sua capacidade autodepurativa. Como agentes de degradação, os fungos basidiomicetos são muito eficientes na degradação de diversos compostos e de corantes, além de possuírem alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados. Os basidiomicetos ligninolíticos produzem enzimas, como lignina peroxidase, manganês peroxidase e outras, que convertem polímeros externos em moléculas menores. Estas são assimiladas e utilizadas como nutrientes. (SOUZA et al., 2009)

Finalmente, faz-se destaque aos processos alternativos utilizados para reduzir a concentração de gorduras nos efluentes, principalmente de indústrias alimentícias. Nesse caso, a utilização de enzimas lipolíticas, como lipases, atua na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas presentes em acilgliceróis (glicerol unido a um ou vários ácidos graxos através de ligações éster). (VALENTE et al., 2010)

2.5 LIPASES

As lipases são definidas como carboxilesterases (E.C. 3.1.1.3) que hidrolisam acilgliceróis de cadeias longas, ou seja, formada por mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a especificidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são conhecidas como esterases (E.C.3.1.1.1). A diferença entre essas duas enzimas está no fato de que os substratos para lipases são óleos e gorduras formados por triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que as esterases atuam em um único tipo de ligação éster, liberando ácidos graxos de baixo peso molecular. Dessa forma, algumas lipases são capazes de hidrolisar os

substratos de esterases, mas o inverso não ocorre. (CASAS-GODOY et al., 2012; MESSIAS et al., 2011)

2.5.1 Fontes e Produção de Lipases

As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os microrganismos, embora estas sejam produzidas também por plantas e animais. As desvantagens de usar lipases animais incluem a presença de hormônios residuais animais ou vírus, bem como seus efeitos indesejáveis no processamento de produtos. Lipases vegetais também estão disponíveis, mas não é uma alternativa explorada comercialmente por causa do rendimento e da complexidade dos processos. Portanto, as lipases microbianas estão atualmente recebendo mais atenção por causa de suas vantagens técnicas e econômicas, onde os organismos são cultivados em meio contendo composição nutricional apropriada sob condições controladas. (SHARMA et al., 2014)

Tanto microrganismos eucariotos (leveduras e fungos) como procariotos (bactérias), são produtores de lipases e suas propriedades variam de acordo com a procedência. As enzimas bacterianas são muito aplicadas na indústria de alimentos para melhoria da qualidade, na indústria de laticínios para hidrólise da gordura do leite e em bebidas para melhorar o aroma. (SHARMA et al., 2014)

Entretanto, as lipases de fungos estão recebendo maior destaque por serem extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo. Os fungos filamentosos têm sido estudados como bons produtores de lipases, sendo os gêneros mais citados *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium*. (COLLA et al., 2012; SANGEETHA et al., 2011)

A produção de lipase fúngica desenvolve-se pelo cultivo em meio de cultura líquido (fermentação submersa) como processo principal, devido a facilidade de execução, controle e por apresentar rendimentos satisfatórios. Contudo, por serem secretadas para fora das células, as enzimas precisam passar por etapas de separação, purificação e imobilização em um suporte, através de processos complexos, gerando lipases instáveis e de custo elevado. (SILVA et al., 2009)

Estas enzimas também podem ser produzidas por fermentação em estado sólido (FES), processo que emprega substratos insolúveis com baixas porcentagens de água. Estes substratos

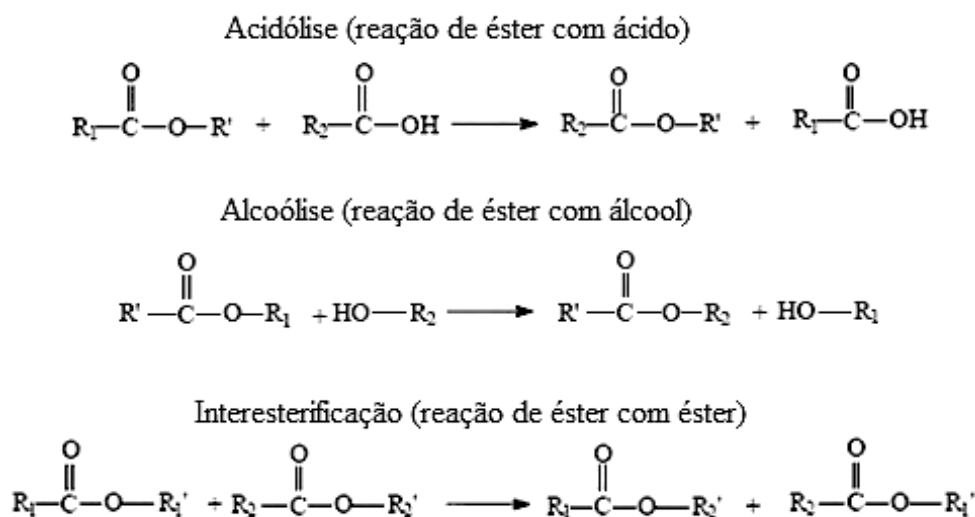
atuam como fonte de nutrientes e como suporte fisiológico. Porém, é um sistema não homogêneo e de difícil monitoramento e controle dos parâmetros. (BHARGAV et al., 2008)

2.5.2 Reações Catalisadas por Lipases

As lipases catalisam várias reações, dentre elas a hidrólise, interesterificação, alcoólise e acidólise. As últimas três reações são geralmente agrupadas e denominadas de transesterificação, conforme apresentado na Figura 7. Esta refere-se à troca de grupos entre um éster e um ácido (acidólise), entre um éster e um álcool (alcoólise), ou entre dois ésteres (interesterificação). A capacidade de lipases para catalisar estas reações com grande eficiência, estabilidade e versatilidade tornam estas enzimas altamente atraentes do ponto de vista comercial, com aplicações em diversos setores industriais. (GARRIDO et al., 2016)

A reação de maior interesse catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise de ésteres. Esta reação ocorre por meio da hidrólise sequencial dos grupos acil no glicerídeo. Dessa forma, após a reação, a mistura contém não somente triacilgliceróis, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis. (FEDDERN, 2010)

Figura 7 - Representação esquemática das reações de transesterificação catalisadas por lipase.



Fonte: FEDDERN (2010).

2.5.3 Fatores que Interferem no Processo de Hidrólise Enzimática de Lipídeos

Os principais fatores que afetam a atividade das lipases são concentração de substrato, pH e temperatura. A velocidade da reação catalisada por enzimas cresce conforme a disponibilidade de substrato presente até atingir a velocidade máxima. Em baixas concentrações ocorre um decréscimo de adsorção de lipase na interface água/óleo, resultando na redução da atividade hidrolítica, não ocorrendo o mesmo em sistemas com elevada concentração de emulsão. (FEDDERN, 2010)

A velocidade das reações enzimáticas aumenta com o acréscimo da temperatura, devido a energia cinética das moléculas do sistema ser maior, aumentando a probabilidade de colisões produtivas por unidade de tempo. Porém uma grande elevação na temperatura, resulta na redução da velocidade de reação e desnaturação da enzima. Cada enzima possui o seu valor ótimo de pH, mas geralmente encontra-se próximo ao neutro, entre 7 e 8. Acima de 8,5 pode ocorrer a saponificação ou emulsificação. Em geral, as lipases apresentam pH ótimo entre 4 e 9, e temperatura desde a ambiente até 70 °C, com ótima entre 30 e 40 °C. (ZANATTA et al., 2017)

2.5.4 Aplicação de Lipases em Tratamento de Efluentes Ricos em Lipídeos

Devido a sua capacidade de degradação de acilgliceróis, as lipases se tornaram compostos de destaque no estudo de alternativas para o tratamento de efluentes e até mesmo equipamentos. A empresa japonesa Meito Sangyo Co., por exemplo, vêm aplicando a lipase produzida pela levedura *Candida rugosa* nas estações de tratamento de efluentes de indústrias nos Estados Unidos para remover sólidos, como gorduras, de equipamentos. (MENDES et al., 2005)

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas sobre a aplicação de lipases na degradação de efluentes ricos em lipídeos. De Felice et al. (1997) estudaram o crescimento e ação da levedura *Yarrowia lipolytica* em efluentes industriais de óleo de oliva. Utilizando lipídeos e açúcares como fontes de carbono, em um sistema aeróbio, verificou-se a redução de 80% de DQO e aumento de 22,45 g/L de biomassa em um período de 24 horas.

Jung et al. (2002) empregaram lipases produzidas pela espécie *Penicillium restrictum* no tratamento de efluentes da indústria de laticínios. A enzima foi utilizada em uma etapa anterior ao tratamento biológico em um reator de lodo ativado. Diferentes concentrações de lipídeos foram

avaliadas (400, 600 e 800 mg/L) em dois reatores, um deles alimentado com o efluente bruto e o outro com efluente hidrolisado. Em um tempo de retenção de 24 h, até a concentração de 600 mg/L, a flora microbiana assimilou a carga orgânica introduzida em ambos os reatores. A partir de 800 mg/L, a eficiência de remoção de DQO no reator controle decaiu, chegando a ser nula, enquanto no reator alimentado com o hidrolisado a eficiência se manteve acima de 90%.

Pereira et al. (2003) analisaram o efeito do pH na utilização da lipase de *Candida rugosa* no tratamento de efluentes de frigoríficos avícolas. As porcentagens de hidrólise mais elevadas foram alcançadas em efluentes tamponados no pH ótimo de 7,0.

Durli (2007) estudou o tratamento de efluentes de laticínios com lipases produzidas por *Burkholderia cepacia* em fermentação no estado sólido (FES). O maior teor de óleos e gorduras removido foi em torno de 70 e 80%, no período de 24 horas de incubação, para as amostras não autoclavadas. Em amostras autoclavadas, com 48 horas de incubação, obteve-se 90% de eficiência de remoção.

Em um estudo mais recentes, Silva et al. (2016) empregaram o mesmo método de produção de lipases por FES com espécies de *Penicillium* no tratamento do efluente de um abatedouro. Em 11 dias de tratamento, utilizando uma incubadora shaker a 30°C e 300 rpm, o pH manteve-se controlado de acordo com a legislação e o teor de gorduras reduziu em 79,8%.

Portanto, considerando a eficiência do uso de enzimas para auxiliar o tratamento de efluentes gerado para diferentes indústrias, o uso de lipases na redução da concentração de lipídeos em efluentes das indústrias de laticínios aparece como uma metodologia interessante para redução de DBO e DQO desses resíduos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi um fungo endofítico isolado do caule da espécie amazônica *Myrcia guianensis* (vassourinha). (BANHOS et al., 2014) Este fungo pertence ao gênero *Talaromyces* (Figura 8), previamente identificado como um bom produtor de lipases. (MATIAS, 2018) e faz parte da coleção de trabalho do grupo de pesquisa Química Aplicada à Tecnologia (QAT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

Figura 8 - Fungo *Talaromyces* sp., isolado da folha de vassourinha (*Myrcia guianensis*).



Fonte: RODRIGUES (2019).

O fungo foi reativado e mantido em Ágar Batata Dextrose (BDA). O cultivo foi feito em placas de Petri e a incubação realizada em BOD, por 5 a 7 dias, a uma temperatura de 28°C.

O inóculo utilizado para a produção de lipase empregou uma suspensão de esporos feita pelo cultivo do fungo em BDA em tubos de ensaio inclinados. Com a adição de 4 mL de água destilada em cada tubo, estes foram agitados para garantir a suspensão dos esporos. Retirando-se uma alíquota de 1000 µL de cada tubo, foi feita a contagem de esporos em câmara de Neubauer ajustando-se a concentração em 10⁶ esporos/mL. (GOMES et al., 2016)

3.2 EFLUENTE

O efluente utilizado neste estudo foi fornecido por uma empresa local especializada na produção de uma grande variedade de produtos lácticos, como iogurtes, queijos, manteiga, requeijão e leite em pó, sendo o sorvete o seu produto mais conhecido. A fábrica que gerou o efluente produz apenas sorvetes e não conta com uma estação de tratamento interna. Porém, seus resíduos são destinados a segmentos terceirizados responsáveis pelo tratamento dos mesmos.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

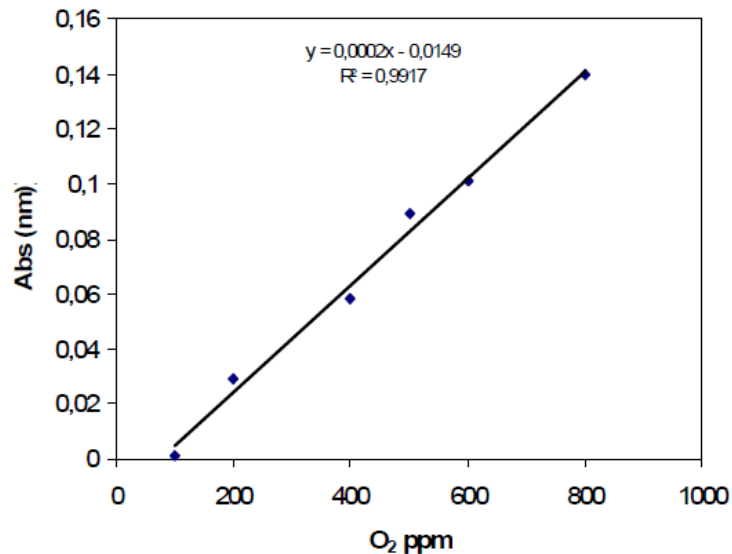
Como o efluente de laticínios contém compostos orgânicos solúveis e sólidos suspensos, estes contribuem em grande parte para sua alta demanda biológica de oxigênio e demanda química de oxigênio. Logo, as características analisadas foram índice de acidez, DQO, sólidos totais, suspensos e sedimentáveis, pH, temperatura, turbidez e concentração de óleos e graxas.

3.3.1 Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A determinação da DQO foi realizada com uso do KIT de DQO (Hanna). O método baseia-se na oxidação química da matéria orgânica por dicromato de potássio em presença de catalisador, a temperaturas controladas. (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1993)

As amostras foram diluídas de forma adequada para as faixas de concentração utilizadas na curva de calibração (Figura 9). Após a diluição realizou-se a leitura das absorbâncias das amostras em um espectrofotômetro a 600 nm, contra controles preparados com água destilada. (DURLI, 2008)

Figura 9 - Curva de calibração para determinação da DQO.



Fonte: DURLI (2007).

3.3.2 Determinação dos Sólidos Totais (ST)

Para determinação dos sólidos totais empregou-se uma cápsula de porcelana limpa previamente seca em mufla durante 1 hora a $550 \pm 5^\circ\text{C}$, seguida do esfriamento em um dessecador até a temperatura ambiente. Após esse processo, o peso da cápsula foi registrado e transferiu-se uma alíquota homogênea de efluente. A cápsula foi levada ao banho-maria para evaporação do efluente, até atingir secura completa. Por fim, a cápsula com resíduo foi esfriada novamente no dessecador até a temperatura ambiente. A pesagem da cápsula com resíduo foi realizada, resultando na quantidade de sólidos totais presentes na amostra, calculada através da Equação 1: (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 2012)

$$ST = \frac{(P1-P0) \cdot 1.000.000}{V_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

Onde:

ST: Sólidos totais em mg/L;

P0: Massa da cápsula em g;

P1: Massa da cápsula com o resíduo em g;

V_{amostra} : Volume da amostra em mL.

3.2.3 Determinação dos Sólidos Suspensos Totais (SST)

A determinação dos sólidos suspensos seguiu o mesmo procedimento inicial de preparo da cápsula descrito no item 3.2.3, mas utilizando um cadinho com uma membrana de fibra de vidro. Com a verificação do peso do cadinho, este foi transferido para um porta filtro adaptado ao kitassato para filtração. Um volume de efluente entre 50 e 200 mL foi filtrado. Após esse processo, o cadinho com resíduo foi levado para a estufa a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ por 1 hora, seguido do esfriamento no dessecador por 30 minutos. O peso do cadinho com resíduo foi registrado, resultando na quantidade de sólidos suspensos presentes na amostra, calculada através da Equação 2 (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 2012):

$$\text{SST} = \frac{(P1-P0)*1.000.000}{V_{\text{amostra}}} \quad (2)$$

Onde:

SST: Sólidos suspensos totais em mg/L;

P0: Massa do cadinho em g;

P1: Massa do cadinho com o resíduo em g;

V_{amostra} : Volume da amostra em mL.

3.3.4 Determinação dos Sólidos Sedimentáveis

Para a determinação dos sólidos sedimentáveis foi utilizado um cone Imhoff. A amostra de efluente utilizada foi vigorosamente homogeneizada e transferida para o cone até a marca de 1000 mL, onde permaneceu em repouso por 45 minutos. Após esse período, agitou-se a parede interna do cone com um bastão de vidro, desprendendo qualquer partícula que tenha ficado no local, seguida de mais 15 minutos de repouso. Somente então foi aferida a quantidade de sólidos não sedimentáveis pela leitura direta no cone Imhoff. (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 2012)

3.3.5 Determinação do pH

O pH foi medido durante o processo de caracterização do efluente com o uso de um pHmetro digital da marca ITMPA210. Com o instrumento já calibrado, os eletrodos do pHmetro foram primeiramente lavados com água destilada. Após estabelecido o equilíbrio entre os eletrodos e a amostra, os eletrodos foram mergulhados na amostra, sendo realizada a leitura do pH. (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 2012)

3.3.6 Determinação da Temperatura

Com o uso de um termômetro, a medição da temperatura foi feita durante a coleta do efluente. O termômetro foi lavado com água de enxágue e mergulhado na amostra por aproximadamente 1 minuto ou mais até que a leitura da temperatura se tornasse constante. Assim, a temperatura foi registrada. (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 2012)

3.3.7 Determinação da Turbidez

A turbidez foi avaliada pelo método nefelométrico. A amostra foi inserida em um tubo de plástico transparente e incolor, sendo previamente agitada para que as bolhas escapem e não interfiram na intensidade da luz dispersa pela amostra. A turbidez foi medida diretamente em um turbidímetro da marca Hanna, sendo expressa em unidades nefelométricas de turbidez (UNT). (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 2012)

3.3.8 Determinação da Concentração de Óleos e Graxas

A determinação do teor de óleos e graxas (TOG), antes e depois do tratamento enzimático, foi realizada pelo método de Soxhlet, empregando hexano como solvente. As amostras foram primeiramente filtradas obtendo-se a porção sólida. Esta foi colocada dentro de um cone de papel de filtro e inserida no tubo extrator de gordura. A extração foi realizada utilizando-se balões de fundo redondo, previamente tarados, contendo 250 mL de hexano, conectados ao extrator Soxhlet durante 9 h. O hexano foi então evaporado em um rotaevaporador e o balão contendo os resíduos

oleosos foi colocado para em uma estufa a 40 °C. A pesagem dos resíduos foi feita até atingir-se peso constante. O procedimento foi feito em triplicada e o cálculo do teor de óleos e graxas foi feito através da Equação 3 (QUEIROS et al., 2005):

$$\text{TOG (mg/L)} = \frac{P_{\text{resíduo}} - P_{\text{balão}}}{P_{\text{amostra}}} \quad (3)$$

Onde:

TOG: Teor de óleos e graxas em mg/g;

P_{balão}: Peso do balão vazio;

P_{resíduo}: Peso do resíduo oleoso extraído no balão;

P_{amostra}: Peso da amostra no papel de filtro.

3.3.9 Determinação do Índice de Acidez

A determinação do teor de acidez foi feita através de alíquotas de 5 mL que foram retiradas do efluente e submetidas a titulação com solução padrão de NaOH 0,1 mol/L com a adição de 3 gotas de fenolftaleína. O teor final de índice de acidez foi obtido através da Equação 4:

$$\text{I.A} = \frac{V(\text{NaOH}) * M(\text{NaOH}) * 1000}{V_a} \quad (4)$$

Onde:

I.A: Índice de acidez (mmoles/mL);

V (NaOH): Volume de solução de NaOH usado na titulação (mL);

M(NaOH): Concentração da solução de NaOH (mol/L);

V_a: Volume da amostra (mL).

3.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM MEIO LÍQUIDO

A produção enzimática seguiu os procedimentos descritos por Nascimento et al. (2014). O cultivo do fungo foi realizado em Erlenmeyers com 100 mL de meio líquido, preparado com 2 g/L NaNO₃; 0,6 g/L de MgSO₄.7H₂O; 1,0 g/L de KH₂PO₄; 10 g/L de peptona e 1% (v/v) de óleo de oliva. O pH foi ajustado para 6,0. O meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos na autoclave.

Os Erlenmeyers foram inoculados com 100 μ L da suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) do fungo *Talaromyces* sp. em condições estéreis. Os frascos foram incubados durante 7 dias a 28°C, em um agitador tipo shaker, operando a 160 rpm. O cultivo foi realizado em triplicata, sendo também realizado um controle do meio de cultivo. Alíquotas de 1 mL foram retiradas diariamente e filtradas para obtenção do extrato enzimático e posterior dosagem da atividade enzimática.

Após determinado o tempo de cultivo onde obteve-se a maior atividade lipolítica, foi feita uma produção em maior escala (2 L), visando a aplicação do extrato enzimático na degradação do efluente da indústria de sorvetes.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Seguindo os procedimentos de Winkler e Stuckmann (1979), a quantificação da atividade enzimática foi feita pela preparação de uma emulsão do substrato palmitato de p-nitrofenila (pNPP) através da adição, gota a gota, de 1 mL da solução A (30 mg de pNPP dissolvidos em 10 mL de isopropanol) em 9 mL da solução B (0,4 g de Triton X-100; 0,1 g de goma arábica e 90 mL de Tampão Tris HCl 50 mM pH 7,0) sob agitação. A estabilização da emulsão e amostras foi feita à 37°C por 5 minutos. O acréscimo de 0,2 mL do sobrenadante em 1,8 mL da emulsão de substrato formou uma mistura que foi incubada por 15 minutos a 40°C. A leitura da absorbância das misturas foi realizada em um espectrofotômetro a 410 nm.

Cada unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1,0 μ mol de p-nitrofenol por minuto sob estas condições (PEREIRA et al., 2015; TOMBINI, 2015). A quantificação da atividade enzimática foi feita com a Equação 5:

$$\text{Atividade enzimática (U/L)} = \frac{\text{abs} \times 10 \times 10^6 \times 4}{12276} \quad (5)$$

Onde:

abs: Absorbância após 15 min de reação, obtida à 410 nm;

10: fator de diluição da enzima no meio reacional;

10^6 : unidades do substrato produzidas no tempo de ensaio (μ mol);

4: fator para converter a atividade para atividade lipolítica por hora;

12276: coeficiente de extração molar do substrato p-nitrofenol.

3.6 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO EFLUENTE

O tratamento consistiu na aplicação direta do extrato enzimático no efluente, seguindo os parâmetros de temperatura em 28°C e agitação de 160 rpm. As variáveis de resposta monitoradas foram índice de acidez e DQO, analisadas após o tratamento enzimático. Os experimentos foram realizados em triplicata, em Erlenmeyers de 250 mL com 80 mL de efluente. O tratamento foi realizado com amostras de efluente bruto (sem autoclavar) e com o efluente autoclavado, para verificar o efeito da ação de microrganismos originalmente presentes no efluente sobre a degradação. (DURLI et al., 2014)

Foi realizado um planejamento experimental completo 2³, conforme a matriz apresentada na Tabela 4, para verificar a influência das variáveis pH e concentração enzimática no tratamento enzimático. Os ensaios foram realizados em duplicata. (RODRIGUES et al, 2005)

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2³

Variáveis codificadas			Variáveis reais	
Ensaio	pH	[C.E]	pH	[C.E] (U/mL)
1	-1	+1	3,5	25,5
2	-1	-1	3,5	12,8
3	-1	+1	3,5	25,5
4	+1	-1	7,0	12,8
5	+1	+1	7,0	25,5
6	-1	-1	3,5	12,8
7	+1	-1	7,0	12,8
8	+1	+1	7,0	25,5

[C.E] = Concentração enzimática.

O programa Minitab 10.0 ($p > 0,05$) foi utilizado para analisar os dados experimentais. Assim, utilizando a ferramenta do planejamento experimental foi possível investigar a influência das variáveis no tratamento enzimático. (RODRIGUES et al, 2005)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

O efluente utilizado neste trabalho foi proveniente de uma indústria de sorvetes que não possui estação de tratamento, logo as análises do efluente gerado não são realizadas pela empresa, sendo necessário a determinação de parâmetros iniciais. Contudo, a empresa forneceu os laudos das análises do efluente depois de tratado, realizadas por um laboratório especializado. Os resultados comparativos estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização do efluente produzido pela Indústria de sorvetes e após passagem pela Estação de Tratamento de Despejos Industriais (ETDI).

Parâmetros	Valores de referência^{1,2}	Efluente bruto	Laudos de tratamento da ETDI
pH ¹	Entre 5 e 9	3,09	5,08
Turbidez ¹ (NTU)	Até 100	634	14,60
Sólidos totais (mg/L)	-	2.623,33	90
Sólidos suspensos ² (mg/L)	100 mg/L	619,53	69
Sólidos sedimentáveis ¹ (mg/L)	Até 1	300	0,10
DBO ¹ (mg/L)	Até 120	-	27
DQO ² (mg/L)	Até 100	5.787,45	68
Óleos e graxas ¹ (mg/L)	Até 50	15.288,06	5

¹CONAMA 357/2005; ²COMDEMA 34/2012.

Em relação ao pH observou-se que o efluente gerado apresenta-se ácido, com pH de 3,09, valor abaixo daquele permitido pela legislação. Geralmente, o efluente gerado na indústria de laticínios tem pH neutro, enquanto o pH do efluente das indústrias de sorvete é levemente ácido, o que se mostra de acordo com o resultado obtido. Essa variação ocorre dependendo dos agentes de limpeza (ácidos e/ou alcalinos) e desinfetantes usados nas operações de sanitização, sendo os mais comuns a soda cáustica, o ácido nítrico, o ácido fosfórico e o hipoclorito de sódio. Dependendo do

produto utilizado na sanitização, as águas residuais podem apresentar uma ampla faixa de valores de pH entre 2,0 e 12,0. (KARADAG et al., 2014; ANDRADE, 2011)

Além de produtos químicos, os efluentes da indústria de laticínios apresentam matérias-primas que são perdidas durante o processo. A composição envolve alta concentração de gordura, leite, proteína, lactose, ácido láctico e minerais. A limpeza do equipamento juntamente com o soro e o soro de leite coalhado contribui para a maior parte da carga orgânica. (CARVALHO, 2012)

O valor de DQO encontrado de 5.787,45 mg/L é considerado elevado quando comparado com resultados encontrados na literatura. Para pequenas indústrias de laticínios, que não têm incentivo econômico para valorizar o soro e precisam tratá-lo como fluxo de resíduos, a carga orgânica realmente torna-se elevada. (MOCKAITIS et al., 2006). De fato, o soro de leite apresenta um elevado poder poluente, que contém de 40 a 70 g/L de DBO ou 60 a 80 g/L de DQO, mesmo que o volume descartado seja pequeno. (MERLIN et al., 2012)

Quanto à turbidez, esta está relacionada com a presença de partículas da matéria orgânica e inorgânica dissolvida. Os valores encontrados nos estudos de efluentes lácteos variam entre 22,5 e 1.557,0 NTU; sendo o valor obtido para o efluente da indústria sorveteira analisado no presente trabalho de 634 NTU. A ampla faixa de variação desse parâmetro depende do processo produtivo da indústria que pode gerar grande quantidade de sólidos em suspensão o que pode potencializar o teor de turbidez. (FERNANDES et al., 2017; MACULAN et al, 2016)

Todos os contaminantes presentes na água, com exceção dos gases dissolvidos, contribuem para a carga de sólidos. Os sólidos totais contribuem para o aumento da matéria orgânica, e vão diminuir a eficiência do sistema, uma vez que os microrganismos demoram mais para degradá-los. Os sólidos suspensos são aqueles que flutam na superfície, formando uma crosta que pode impedir a penetração da luz solar e também contribui para o aumento da temperatura, causando ineficiência no tratamento biológico. Para os sólidos suspensos relatam-se concentrações entre 124,29 e 3.317,00 mg/L, o que se mostra de acordo com o resultado encontrado. (FERNANDES et al., 2017)

4.2 PRODUÇÃO DE LIPASE

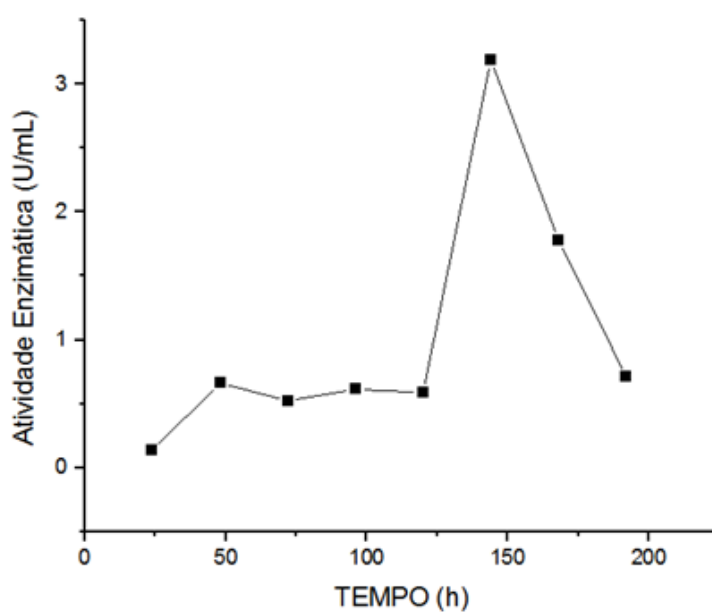
Para a produção de lipase, o fungo foi cultivado usando como fonte de carbono o óleo de oliva (1%) e suas atividades enzimáticas foram avaliadas diariamente. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo apresentados na Tabela 6 os valores obtidos em cada ensaio, bem como os valores das médias e o desvio padrão.

Tabela 6 - Atividade enzimática de lipase produzida pelo fungo *Talaromyces* sp.

Tempo (h)	Amostra 1 (U/mL)	Amostra 2 (U/mL)	Amostra 3 (U/mL)	Atividade Enzimática¹ (U/mL)
24	0,1086	0,2585	0,0391	0,135 ± 0,112
48	0,5952	0,5148	0,8732	0,661 ± 0,188
72	0,4084	0,4453	0,7155	0,523 ± 0,168
96	0,5257	0,5995	0,7125	0,613 ± 0,094
120	0,5778	0,4714	0,7103	0,587 ± 0,120
144	3,1585	3,2128	3,2041	3,192 ± 0,029
168	2,0311	2,0354	1,2621	1,776 ± 0,445
192	1,4891	0,2085	0,4334	0,710 ± 0,684

¹ Média ± Desvio Padrão.

A partir dos dados acima, construiu-se um gráfico da cinética da atividade enzimática, ilustrado pela Figura 10 abaixo.

Figura 10 - Atividade lipolítica do meio de cultivo do fungo *Talaromyces* sp.

É possível observar na Figura 10 que a produção de lipase pelo fungo *Talaromyces* sp. foi maior no sexto dia (144 h) com uma atividade enzimática de $3,192 \pm 0,029$ U/mL, sofrendo um declínio após esse período. A diminuição na atividade da lipase pode estar relacionada ao efeito do pH; temperatura; escassez de nutrientes; ou ainda devido a produção de proteases pelo microrganismo, como relatado por Gombert et al. (1999). A presença de proteases no meio pode causar a desativação da lipase e até mesmo a perda completa da atividade enzimática. (DI LUCCIO et al., 2004)

Estudos realizados por Romdhane et al., (2010) constataram que o fungo *Talaromyces thermophilus* consegue obter uma produção de $12 \pm 1,3$ U/mL de atividade enzimática em 72 h utilizando azeite de oliva (2%) como fonte de carbono. Apesar de empregar a mesma fonte de carbono que estes autores, a atividade enzimática observada no presente estudo foi menor ($3,192 \pm 0,029$ U/mL). A produção de lipase fúngica depende de diversos fatores, como fontes de nitrogênio, pH, temperatura e agitação. (GEOFFRY et al., 2018) Romdhane et al., (2010) utilizaram como fonte de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ureia e extrato de levedura, suplementando o meio de cultivo com uma solução de oligoelementos (MnSO_4 ; ZnSO_4 ; FeSO_4 ; e CaCl_2). Esta combinação pode ter auxiliado na maior produção de lipase.

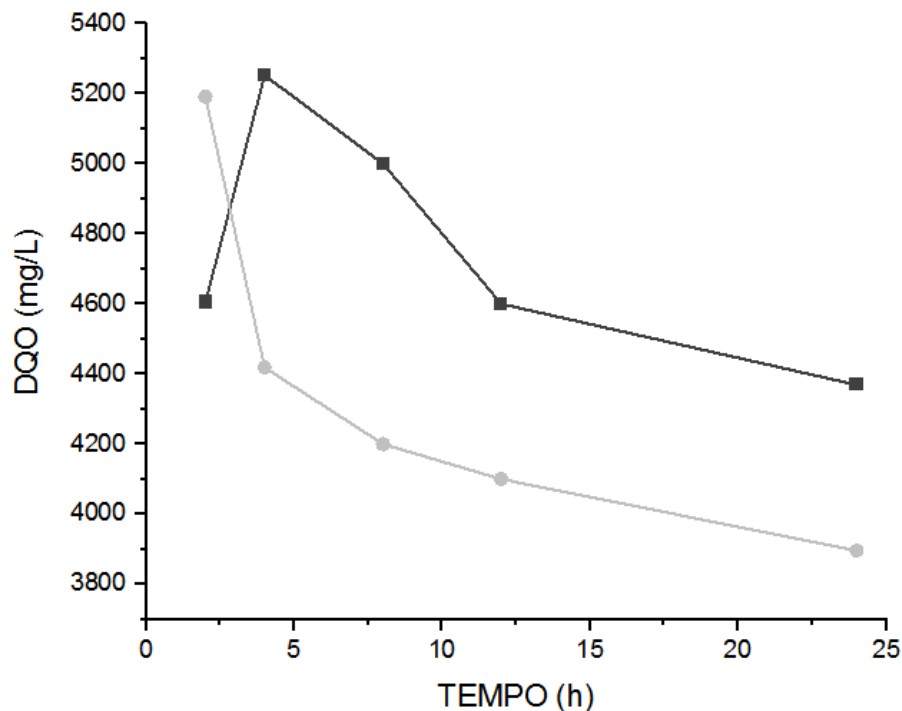
A produção de lipase fúngica é estimulada por substratos lipídicos como azeite de oliva, óleo de canola, óleo de milho, entre outros. Esse aumento da produção de lipase foi observado em organismos como *Fusarium oxysporum*, *Antrodia cinnamon* e *Rhizopus homothalicus* quando cultivados na presença de fontes oleosas. Os óleos atuam como fontes de carbono, sendo utilizados geralmente em baixa concentração (1-5%). Quando uma quantidade significativa de óleo é usada, a produção de lipase diminui devido à limitação da transferência de oxigênio, resultando em baixo crescimento microbiano. (NIYONZIMA et al., 2013) No presente estudo, a concentração de óleo utilizada (1%) foi mais baixa que a utilizada por Romdhane et al. (2010), podendo ter influenciado na reduzida produção enzimática.

4.3 TRATAMENTO ENZIMÁTICO

4.3.1 Determinação do Tempo de Tratamento e do Tipo de Efluente

Inicialmente, foi realizado um tratamento para avaliação da cinética da hidrólise enzimática, avaliando-se DQO e índice de acidez, utilizando o efluente na forma bruta e o efluente autoclavado. Os resultados obtidos para DQO encontram-se na Figura 11.

Figura 11 - Variação da DQO do efluente bruto (● —) e do efluente autoclavado (■ —) durante o tratamento enzimático utilizando extrato lipolítico de *Talaromyces* sp.



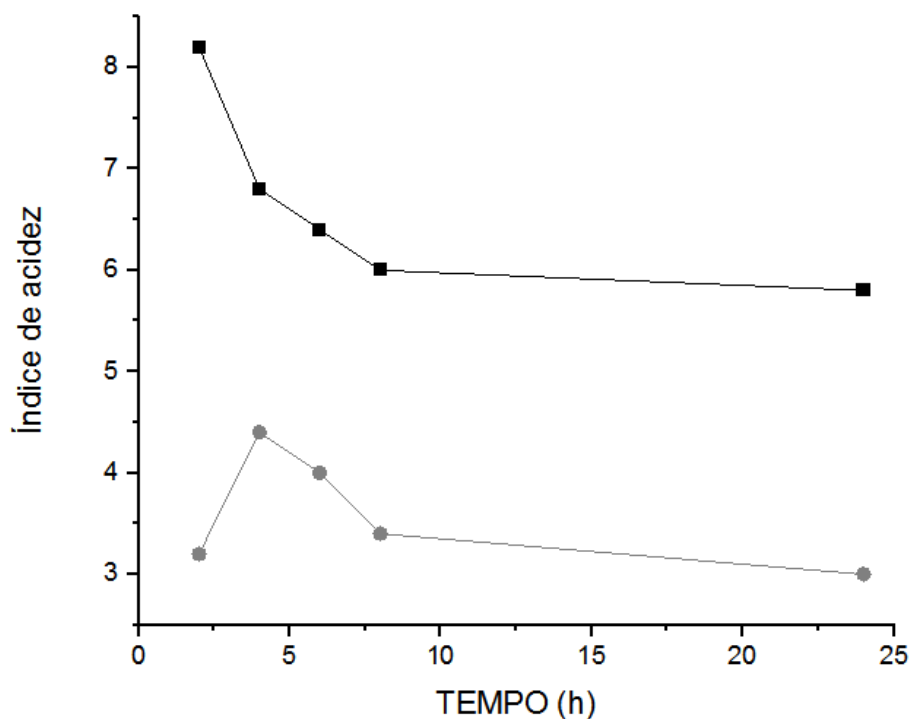
É possível observar na Figura 11 que, para o efluente bruto, a DQO apresentou uma redução (15%) em 4 horas de tratamento. Após esse período ocorreu apenas um decréscimo de aproximadamente 12% até o final das 24 h de tratamento.

Para o efluente autoclavado, a DQO apresentou inicialmente um aumento, o que não era esperado. O processo de autoclavar torna o efluente livre da atuação de outros microrganismos presentes e garante que apenas a lipase adicionada está atuando na degradação. (DURLI, 2007) Porém, o processo de esterilização do efluente também leva a um aumento na temperatura e pH e

composição da carga orgânica do meio. Segundo Von Sperlling et al. (2009), tal fato implica na eliminação da microbiota presente inicialmente no efluente e, conseqüentemente, na redução da atividade enzimática para a degradação do efluente.

Outro parâmetro analisado como resposta ao tratamento enzimático do efluente da indústria de sorvetes foi o índice de acidez, apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Variação do índice de acidez do efluente bruto (● —) e do efluente autoclavado (■ —) durante o tratamento enzimático utilizando extrato lipolítico de *Talaromyces* sp.



O índice de acidez representa a massa de hidróxido de sódio (NaOH) utilizada na neutralização dos ácidos graxos livres presentes em um grama de amostra de óleo. A acidez provém da hidrólise parcial dos triglicerídeos e, por isso, é associada ao grau de degradação do óleo. (SILVA et al., 2013)

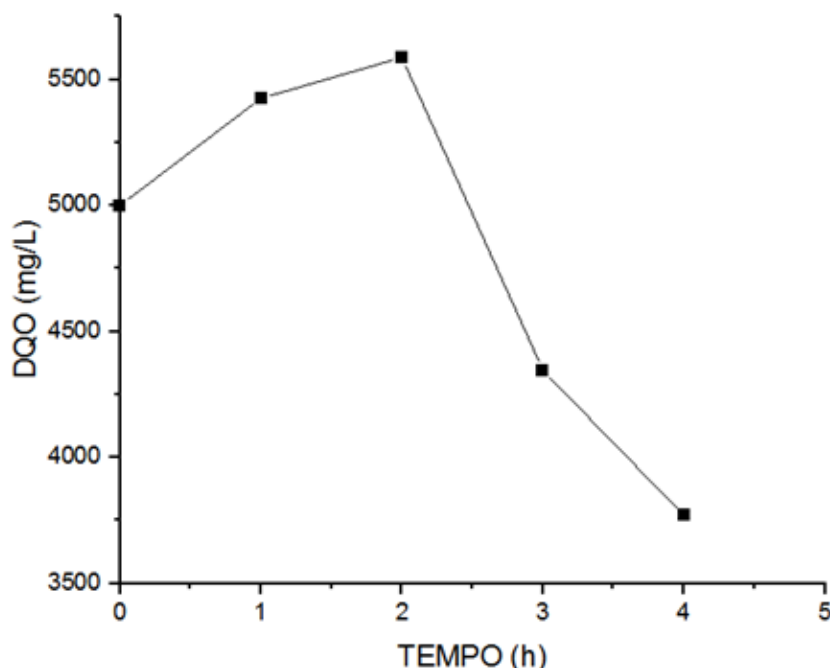
Segundo Leal et al. (2006), quanto maior a quantidade da concentração de óleos e graxas do efluente, maior a quantidade de ácidos livres presentes nas amostras tratadas por lipases. O aumento do índice de acidez no efluente bruto até 4 horas representa a ação da atividade da lipase do fungo *Talaromyces* sp., podendo também estar associado à atividade de enzimas de outros microrganismos presentes no efluente (para o efluente não autoclavado).

Analisando os resultados apresentados nas Figuras 11 e 12, verifica-se que a redução de DQO tendeu a se estabilizar após 4 horas de reação, nas duas condições investigadas. Além disso, tanto o aumento do índice de acidez quanto a redução da DQO foram maiores para o efluente bruto. Dessa forma, por razões práticas e operacionais, o tempo de reação selecionado para o processo de hidrólise foi de 4 horas, optando-se por utilizar o efluente bruto nas próximas etapas do estudo.

4.3.2 Tratamento com Efluente Bruto

A variação de DQO durante 4 horas de tratamento enzimático está apresentada na Figura 13. Houve uma redução de 5.000,11 para 3.769,45 mg/L de DQO, o que corresponde a 24,61% de redução.

Figura 13 - Variação da DQO durante o tratamento enzimático do efluente de uma indústria de sorvetes.



O resultado obtido no presente estudo apresentou-se distinto dos obtidos por outros autores. Mendes et al. (2006) obtiveram uma remoção de DQO de 78,2% para o efluente da indústria de laticínios pré- hidrolisado, contra 40% para o efluente não tratado com enzima, utilizando uma lipase obtida do pâncreas de suíno. Por sua vez, Cammarota et al. (2001) e Leal et al. (2002),

obtiveram redução de 90% na DQO em testes realizados com efluentes industriais de laticínios pré-hidrolisados com 0,2% (m/v) de lipases produzidas pelo fungo *Penicillium restrictum*.

Esse resultado abaixo do reportado por outros autores pode ser justificado devido a quantidade excessiva de gordura no efluente da indústria sorveteira que pode ser fator limitante na eficiência de conversão e remoção lipídica. Jung et al. (2002) demonstraram que há uma redução da eficiência do tratamento do efluente com o aumento da concentração de lipídios, apresentando eficiência de remoção de DQO nula quando a concentração de óleos e gorduras aplicada foi igual ou superior a 800 mg/L.

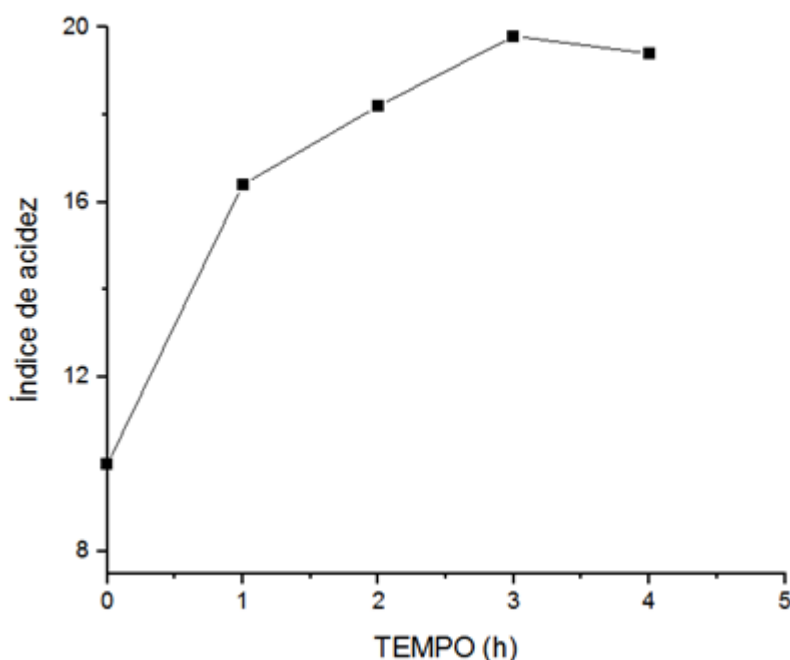
Além disso, a ativação da lipase depende da formação de uma interface lipídeo/água e da adsorção da enzima nessa interface. Quanto menor a razão óleo/água maior será a extensão da hidrólise. O excesso de óleos e gorduras, em especial ácidos graxos de cadeia longa, também poderia gerar efeitos inibidores na produção de enzima, desestabilizando o sistema de pré-tratamento. (LIMA, 2015)

Um fator interessante é verificado no gráfico da Figura 13, onde observa-se o aumento da DQO durante as duas horas iniciais de tratamento, fato que não era esperado. A DQO mede, indiretamente, a concentração de matéria orgânica oxidada presente na amostra. Porém, causará aumento de DQO a amostra que contiver substâncias orgânicas e/ou inorgânicas passíveis de oxidação pelo dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ácido. Em efluentes domésticos, a fração orgânica supera a fração inorgânica reduzida, e a DQO pode ser utilizada para quantificar diretamente a matéria orgânica oxidável presente. Porém, efluentes industriais, como aqueles provenientes de indústrias de laticínios, podem conter significativas concentrações de substâncias inorgânicas reduzidas, que podem ser oxidadas pelo dicromato, causando um aumento na DQO. (AQUINO et al., 2006)

Dessa forma, para verificar ainda a eficiência do tratamento estudado, avaliou-se o índice de acidez que apresentou um aumento de 90%, como pode ser observado na Figura 14.

Durli (2007) estudou a produção de ácidos graxos livres durante o tratamento enzimático, também com lipase, de um efluente bruto proveniente de uma indústria de laticínios. Foi observada a produção de ácidos livres no meio até 5 h de tratamento. Após esse período o autor observou uma estabilização ou pequeno decréscimo (entre 2 e 22 %) do I.A. A redução do índice de acidez pode ser explicada pelo crescimento de microrganismos no efluente, que podem utilizar os ácidos livres como fonte de carbono.

Figura 14 - Variação do índice de acidez durante o tratamento do efluente de uma indústria de sorvetes.



Cabe ressaltar que uma vez que as amostras de efluente tratadas não foram autoclavadas, estes resultados podem ser atribuídos tanto à atividade da lipase do fungo *Talaromyces* sp., como a atividade de enzimas de outros microrganismos presentes no efluente.

4.4 ESTUDO DAS VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM O TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Neste estudo, o tratamento do efluente foi realizado utilizando o planejamento estatístico com 2 variáveis independentes: concentração enzimática e pH. As variáveis respostas foram as concentrações de DQO e de índice de acidez (I.A), obtidas para o efluente bruto tratado no período de 4 horas. Os resultados encontram-se dispostos na Tabela 7.

A partir dos resultados observados na Tabela 7, pode-se verificar que os fatores que proporcionaram a maior redução de DQO e o maior aumento do I.A foram o maior pH (7,0) e a menor concentração de lipase (12,8 U/mL), ensaio 7, utilizando o fungo *Talaromyces* inoculado diretamente no efluente não autoclavado.

Tabela 7 - Valores de DQO e de índice de acidez do efluente de uma indústria de sorvetes tratado com o extrato lipolítico de *Talaromyces* sp., obtidos a partir de um planejamento experimental fatorial completo 2^3 , avaliando o efeito do pH e da concentração enzimática.

Variáveis codificadas			Variáveis reais		Respostas	
Ensaio	pH	[C.E] (U/mL)	pH	[C.E] (U/mL)	DQO (mg/L)	I.A
1	-1	+1	3,5	25,5	2.284,5	1,4
2	-1	-1	3,5	12,8	9.169,5	0,8
3	-1	+1	3,5	25,5	22.259,5	0,2
4	+1	-1	7,0	12,8	7.456	1,2
5	+1	+1	7,0	25,5	4.324,5	1,0
6	-1	-1	3,5	12,8	10.784,5	0,4
7	+1	-1	7,0	12,8	17.364,5	1,8
8	+1	+1	7,0	25,5	25.234,5	0,4

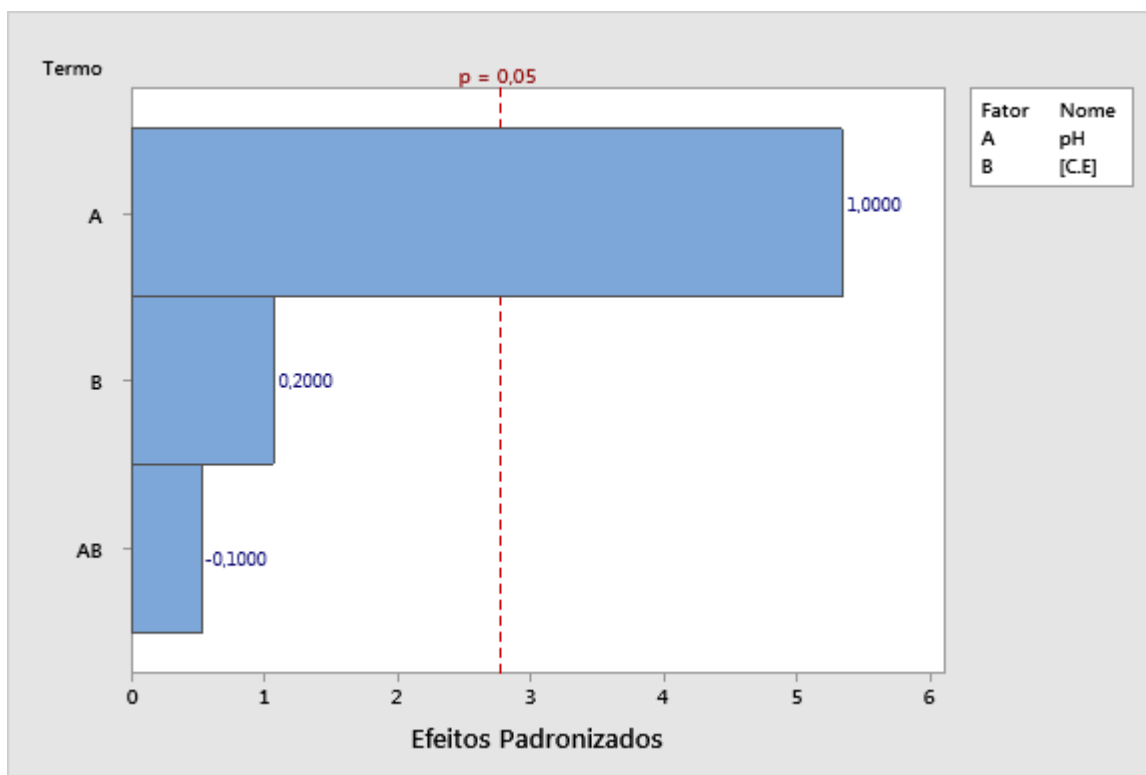
[C.E] = Concentração enzimática; I.A = Índice de acidez.

A partir da análise estatística, com intervalo de confiança de 95%, foram obtidos os valores dos efeitos de cada parâmetro estudado (concentração enzimática e pH) sobre a DQO e o I.A. O diagrama de Pareto apresenta de forma rápida e clara os efeitos que são estatisticamente importantes. A Figura 15 apresenta o diagrama de Pareto para os valores de índice de acidez.

Em experimentos envolvendo planejamentos fatoriais, examina-se a magnitude e a direção dos efeitos dos fatores para identificar as variáveis de importância. Analisando a Figura 15, para o índice de acidez, o único efeito que apresenta significância estatística é o pH, sendo este positivo. Isto indica que aumentando-se do nível baixo (3,5) para o nível alto (7), ocorre um aumento significativo do índice de acidez.

A literatura apresenta resultados de pH ótimo para lipases microbianas em uma faixa de valores semelhantes aos determinados neste trabalho para o fungo *Talaromyces* sp. O pH ótimo de atividade lipásica determinado por Maldonado (2006) para a enzima bruta e purificada produzida por *Geotrichum candidum* foi de 7,0. Duas espécies de *Aspergillus* isoladas de solo contaminado com óleo diesel foram selecionadas por Colla et al. (2015) como bons produtores de lipases em pH 7,2. Silva (2016) estudou o efeito do pH sobre a atividade lipásica por *Yarrowia lipolytica* e verificou picos da atividade nos valores de pH 5,0 e 7,0.

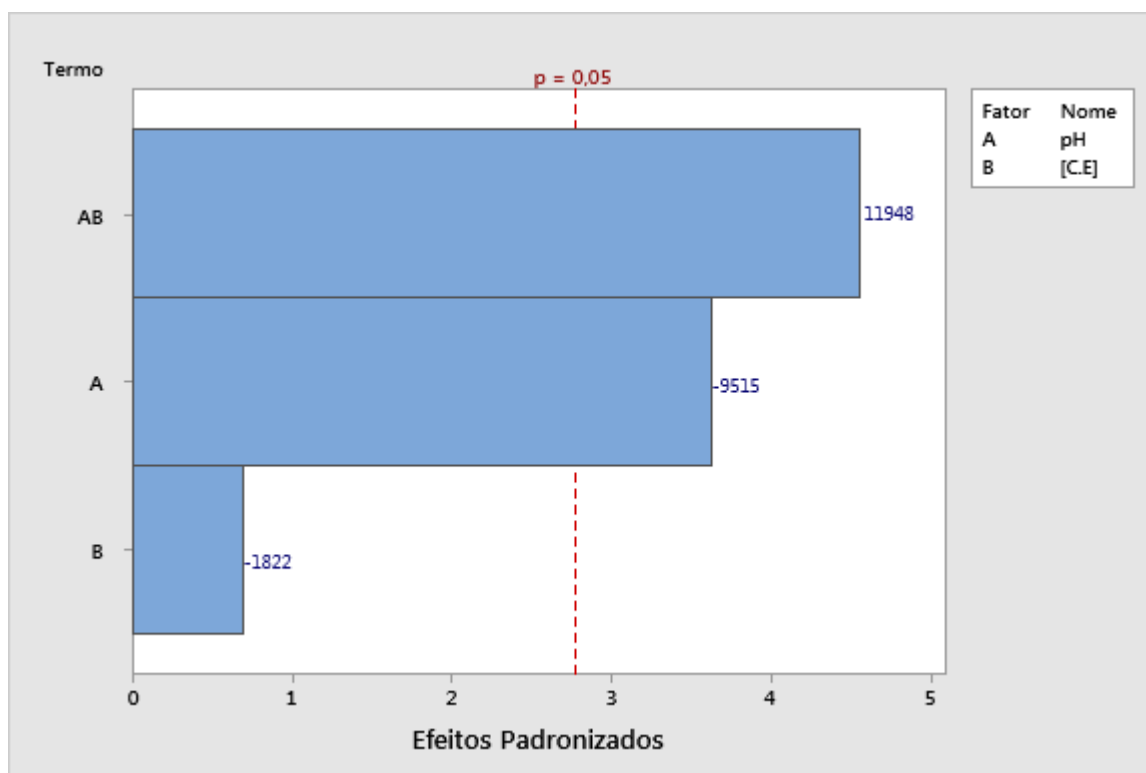
Figura 15 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados tendo como resposta o índice de acidez do efluente de uma indústria de sorvetes, após tratamento enzimático.



Outro parâmetro escolhido para avaliação do tratamento enzimático do efluente foi a DQO, já que os óleos e as graxas e, conseqüentemente, a DQO presentes nos efluentes estão entre os principais agentes contaminantes a serem removidos nos processos de tratamento e as empresas produtoras precisam obedecer às normas, cada vez mais rígidas, para descarte de seus efluentes, de forma que existe a necessidade do constante monitoramento dos seus rejeitos. (DA SILVA, 2017) A Figura 16 a seguir apresenta o diagrama de Pareto para os valores da obtidos após o tratamento enzimático.

Analisando a Figura 16, observa-se que para a DQO dois efeitos são significativamente importantes, sendo estes o pH isoladamente e a interação entre concentração enzimática e o pH. Em experimentos fatoriais pode-se, por meio dos efeitos das interações, verificar se um fator é independente ou dependente do outro. Se uma interação for significativa indica que a resposta de um fator depende da presença ou ausência do outro. Nestes casos, uma das alternativas é estudar o comportamento de um fator dentro de cada nível de outro fator. (PERECIN et al., 2008) Dessa forma, na Figura 17 temos a interação dos parâmetros analisados para a DQO.

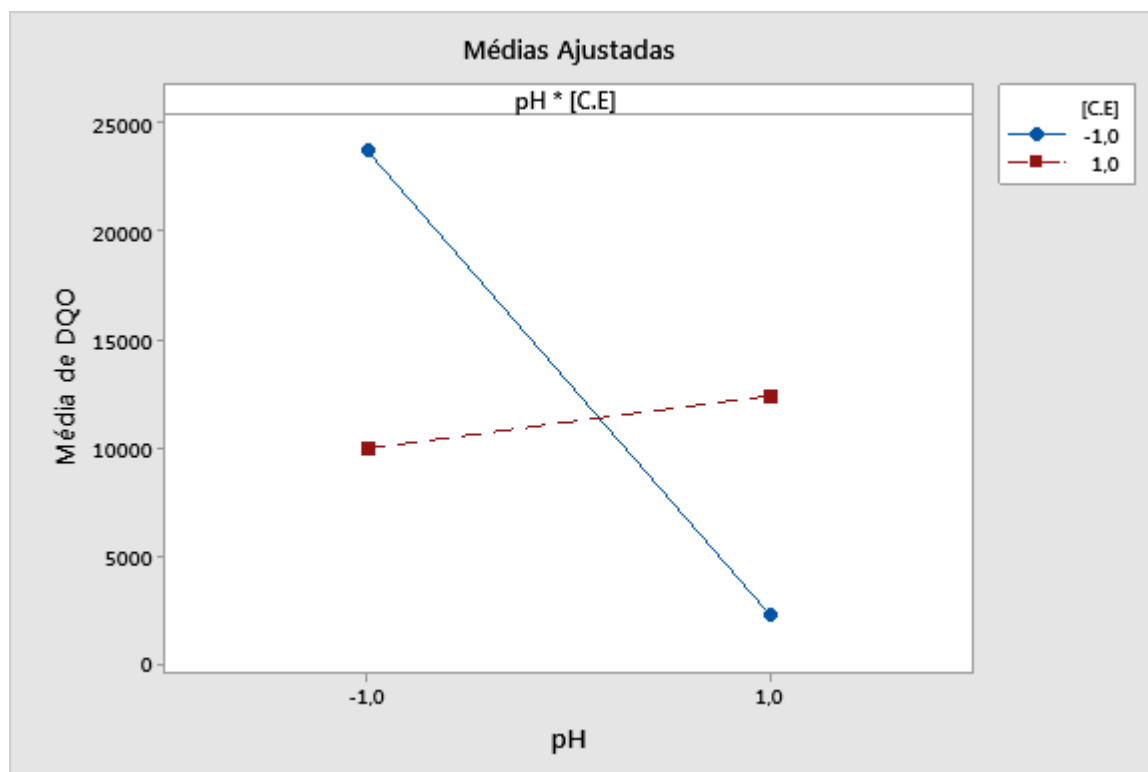
Figura 16 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados tendo como resposta a DQO do efluente de uma indústria de sorvetes, após tratamento enzimático.



Percebe-se na Figura 17 que o resultado que apresenta a maior redução de DQO é aquele de maior pH (7,0) e menor concentração enzimática (12,8 U/mL). Segundo Rodrigues et al. (2014), o comportamento observado sugere que o uso de níveis de enzima muito elevados pode ter causado o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa. Cirne et al. (2007) concluíram que a adição de lipase aumenta a hidrólise de lipídeos, mas as vantagens da adição de enzimas sobre os processos de degradação lipídica foram minimizadas devido à maior disponibilidade de ácidos graxos de cadeia longa e polifenóis limitantes do processo.

A hidrólise lipídica pode ser inibida pelo acúmulo de produto devido à particularidade das lipases, que geralmente requerem que uma interface seja ativada. Como um fenômeno interfacial, o mecanismo de hidrólise lipídica é uma função da concentração e da qualidade da interface. As lipases apresentam uma estrutura anfifílica que permanecerá na interface entre água e lipídio e, conseqüentemente, as propriedades físicas e químicas da interface podem mudar, inibindo a degradação de lipídeos. (CIRNE et al. 2007)

Figura 17 - Gráfico de interação entre o pH e a concentração enzimática para a DQO.



4.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO

O tratamento enzimático consistiu em tratar previamente o efluente, deixando-o com uma carga orgânica reduzida e com menor concentração de gorduras. (LEAL et al., 2002) Dessa forma, o teor de óleos e gorduras (TOG) foi utilizado para avaliar a eficiência do tratamento enzimático. O TOG foi determinado tanto no efluente bruto, quanto naqueles experimentos que foram identificados como contendo as melhores condições de tratamento enzimático, com pH em 7,0 e concentração enzimática de 12,8 U/mL e 25,5 U/mL. Este último foi avaliado para fins de comparação. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados encontram-se na Tabela 8.

Quanto à redução de óleos e gorduras, verificou-se uma redução de 88,72% para a amostra com maior concentração enzimática e 94,50% para a amostra com menor concentração de lipase, ou seja a eficiência do tratamento enzimático do efluente da indústria de sorvetes foi de 88,72% e de 94,50%, utilizando-se 25,5 U/mL e 12,80 U/mL, respectivamente. Tais resultados corroboram com o que foi observado no planejamento experimental, onde os parâmetros mais significativos (a

concentração enzimática e o pH), influenciaram na redução do TOG e se mostram de acordo com os resultados encontrados na literatura.

Tabela 8 - Teor de óleos e gorduras nas amostras de efluente de uma indústria de sorvetes, bruto e tratado enzimaticamente.

Amostras	pH	[C.E] (U/mL)	TOG (mg/L)
Efluente bruto	3,09	-	15.288,06 ± 0,56
Tratado	7,00	25,50	1.724,26 ± 0,89
Tratado	7,00	12,80	840,87 ± 0,93

[C.E] = Concentração enzimática; TOG = Teor de óleos e gorduras.

Rosa (2004) obteve a redução de óleos e graxa do efluente sintético constituído por leite em pó desnatado de aproximadamente 53% depois de 24 h de tratamento com lipase. Cammarota et al. (2001) trataram efluentes de laticínio em reator UASB, o qual foi operado com efluente hidrolisado com lipases produzidas por *Penicillium restrictum*, reduzindo cerca de 90% o teor de óleos e gorduras. Por outro lado, Jeganaethan et al. (2006) reportaram a utilização de lipase de *Candida rugosa* no tratamento de efluente de indústria de rações de animais domésticos, com a remoção de 40 a 60% do TOG, após 3 dias de incubação.

No presente trabalho, os resultados obtidos na remoção de grande parte do teor de óleos e gorduras mostram a importância do pré-tratamento enzimático, pois a presença de uma elevada quantidade de lipídeos afeta negativamente os tratamentos biológicos posteriores que garantem a retirada da carga orgânica. Além disso, o efluente hidrolisado tem uma carga orgânica inicial menor devido à redução do tamanho das partículas de matéria orgânica. Partículas menores provenientes da degradação de gorduras pelas lipases presentes no meio, facilitam a assimilação da matéria orgânica pela ação microbiana. (ROSA, 2004)

Porém, a fim de conhecer todas as variáveis que devem ser controladas e monitoradas, no processo completo do tratamento de efluentes por hidrólise enzimática outras variáveis deverão ser consideradas (temperatura, tempo, agitação) para garantir que o processo enzimático funcione de forma eficiente e em grande escala.

5 CONCLUSÕES

Após o estudo de produção e aplicação de lipase fúngica na degradação de um efluente com elevado teor de gordura, proveniente de uma indústria de sorvetes, pode-se concluir que o efluente escolhido apresentava as características essenciais para a aplicabilidade do processo, com elevados teores de óleos e gorduras, DQO e sólidos, devendo passar por um tratamento preliminar de forma a evitar a queda de eficiência do processo global de tratamento.

O microrganismo escolhido para o estudo, *Talaromyces* sp., apresentou um pico de produção de lipase em cultivo submerso no sexto dia de análise, de 3,192 U/mL. Essa atividade enzimática mostrou-se adequada para a utilização do extrato enzimático na degradação do efluente.

Nos ensaios prévios, a degradação do efluente foi avaliada com o efluente autoclavado e bruto. Este último apresentou os melhores resultados para redução de DQO e aumento do índice de acidez em até 4 horas de reação e, por razões práticas e operacionais, este foi o tempo de reação selecionado para o processo de hidrólise.

Para o ensaio de degradação do efluente, o parâmetro DQO apresentou uma redução de 24,61%, abaixo do esperado. Fato este que pode estar associado ao elevado teor de óleos e graxas presentes. Quanto ao índice de acidez, este apresentou um aumento de 90%, seguido de pequeno decréscimo, possivelmente pelo crescimento de microrganismos no efluente.

A análise dos fatores de pH e concentração enzimática, através de um planejamento fatorial, mostraram que em meios neutros e com menores concentrações enzimáticas obtêm-se resultados mais satisfatórios de remoção de DQO e de aumento de índice de acidez, otimizando assim o processo.

Além disso, nas análises adicionais do teor de óleos e gorduras, para verificar a eficiência do tratamento, foi obtida uma redução de 88,72% para a amostra com maior concentração enzimática e 94,50% para a amostra com menor concentração. Tais resultados validam a influência dos parâmetros mais significativos (concentração enzimática e pH) escolhidos para análise.

Dessa forma, a pesquisa realizada apresentou resultados muito relevantes e, em alguns casos, até melhores do que alguns evidenciados na literatura referente ao tratamento enzimático de efluentes gordurosos. Porém, ainda há fatores que devem ser analisados buscando-se a otimização da metodologia e dos parâmetros empregados.

6 PERSPECTIVAS

Alguns pontos que visam a otimização do processo podem ainda ser estudados em trabalhos futuros:

- Análise de outros parâmetros, como o efeito do teor de óleos e graxas, nos ensaios preliminares;
- Estudo da variação do efluente ao longo do tratamento, estabelecendo sua composição, pH, temperatura, entre outros;
- Verificar a influência de outros componentes no tratamento enzimático, como presença de detergentes, aumento do tempo de processo, agitação, temperatura, entre outros;
- Avaliação do tratamento enzimático em conjunto com um processo biológico.

REFERÊNCIAS

- AL-SHAMMARI, S. B.; BOU-HAMAD, S.; AL-SAFFAR, A.; SALMAN, M.; AL-SAIRAFI, A. Treatment of dairy processing wastewater using integrated submerged membrane microfiltration system. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 1-6, 2015.
- ALBERTON, D. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios**. 2009. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22.ed. American Public Health Association: Washington, 2012.
- ANDRADE, L. H. **Tratamento de efluente de indústria de laticínios por duas configurações de biorreator com membranas e nanofiltração visando o reúso**. 2011. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- AQUINO, S. F.; SILVA, S. Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise de efluentes anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.11, n. 4, p. 295-304, 2006
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE SORVETES. **Produção e Consumo de Sorvetes no Brasil**. Disponível em: http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html. Acesso em: 20 de março de 2019.
- BARROS, R. Energia de biogás da digestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos e de aterros sanitários. **Revista O Futuro da Energia**, v. 1, n. 1, p. 1-10. 2016.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation: an overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49-70, 2008.
- BRITZ, T. J.; VAN SCHALKWYK, C.; HUNG, Y. T. Treatment of dairy processing wastewaters. In: WANG, L. K.; HUNG, Y. T.; LO, H. H.; YAPIJAKIS, C. (Eds.) **Waste Treatment in the Food Processing Industry**. CRC Press: Florida, 2006.
- CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2195-2210, 2006.
- CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G. A.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 19, p. 1591-1595, 2001.
- CARVALHO, K. D. **Utilização de soro de leite doce na fabricação de sorvete de massa**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável e Qualidade de Vida). Centro

Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – UNIFAE. São João da Boa Vista, São Paulo, 2012.

CARVALHO, L. F. F.; SOARES JUNIOR, M. S.; CASTIGLIONI, G. L. **Aplicação de lipase microbiana no tratamento de resíduos oleosos**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, 2014.

CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; SANDOVAL, G.; MARTY, A. Lipases: an overview. In: SANDOVAL, G. (Ed.) **Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology, v. 861. Springer Science: New York, 2012.

CIRNE, D. G.; PALOUMET, X.; BJÖRNSSON, L.; ALVES, M. M.; MATTIASSON, B. Anaerobic digestion of lipid-rich waste - effects of lipid concentration. **Renewable Energy**, v. 32, n. 6, p. 965-975, 2007.

COLLA, L. M.; FICANHA, A. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

COMDEMA nº 34, de 27 de julho de 2012, publicada no Diário Oficial do Município de Manaus, Ano XIII, Edição 2979, de 27 de julho de 2012. Disponível em: <http://dom.manaus.am.gov.br/pdf/2012/julho/DOM%202979%2027.07.2012%20CAD%201.pdf>. Acesso em: 24 de Abril de 2019.

COMPANHIA ITUANA DE SANEAMENTO (CIS). Água. Disponível em: <https://cis-itu.com.br/servicos/agua/>. Acesso em: 12 de Maio de 2019.

CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, p. 262-279, publicada no Diário Oficial da União, n. 53, Seção 1, p. 58-63, de 18 de março de 2005. Disponível em: <http://www.saneago.com.br/novasan/leis/conama.pdf>. Acesso em: 24 de Março de 2019.

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

DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D.; FREIRE, D. M.; DE OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113-116, p. 173-180, 2004.

DURLI, E. **Tratamento de efluentes de indústrias de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11**. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Química, Universidade do Estado do Paraná, Curitiba, 2007.

FEDDERN, V. **Produção de lipídios funcionais por ação de lipase fúngica**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2010.

FERNANDES, T. A.; NAVAL, L. P. Potencial de utilização de efluentes tratados de laticínios. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, n. 46, p. 46-59, 2017.

GARRIDO, J. V. M. L.; SILVA, C. F. Prospecção tecnológica e científica da utilização de lipases microbianas para tratamento de efluentes. **Cadernos de Prospecção**, v. 9, n. 3, p. 298, 2016.

GOFF, H. D; HARTEL, R W. **Ice cream**. Nova York: Springer Science & Business Media, 2013.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v 3, p. 85-90, 1999.

GOMES, E. M. C.; PENA, R. M. C. M. Isolamento, caracterização morfológica e avaliação do crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura de cepas do fungo *Quambalaria* sp. **Biota Amazônia**, v. 6, n. 4, p. 59-63, 2016.

JUNG, F. B.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic prehydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 21, p. 1797-1802, 2002.

KARADAG, D.; KÖROĞLU, O. E.; OZKAYA, B.; CAKMAKCI, M. A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 262-271, 2015.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; ANNA Jr, S. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D. M.; CAMMAROTA, M. C.; SANT'ANNA, G. L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1173-1178, 2006.

LIMA, V. O. **Pré-tratamento de efluente de curtume por bactérias e enzima lipolíticas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

MACHADO, E. P.; XAVIER, C. R.; COUTO, G. H. Tratamento de efluente kraft em lagoa aerada facultativa empregando enzimas lignocelulolíticas. **Interciencia**, v. 43, n. 8, p. 590-596, 2018.

MACULAN, J. L.; LUZZA, M.; POKRYWIECKI, J. C.; DUSMANN, E.; TONIAL, I. B.; POKRYWIECKI, T. S. Aplicação de fotoirradiação solar para tratamento de efluentes de laticínios. **Tecnologia e Ambiente**, v. 22, p. 24-33, 2016.

MAGANHA, M. F. B. **Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos**. São Paulo: CETESB, 2006.

MALDONADO, R. R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, São Paulo, 2006.

MARQUARDT, L.; ROHLFES, A. L. B.; BACCAR, N. M.; OLIVEIRA, M. S. R.; RICHARDS, N. S. P. S. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. **Tecno-Lógica**, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2012.

MARTINS, H. **Tratamento de efluentes na indústria de papel e celulose**. 2014. Disponível em: <http://www.revistatae.com.br/7197-noticias>. Acesso em 02 de maio de 2019.

MATIAS, R. R. **Produção de enzimas hidrolíticas por fungos endofíticos e avaliação do seu potencial de degradação de biofilme de *Staphylococcus aureus***. Dissertação (Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2018.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

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

MERLIN, G.; KOHLER, F.; BOUVIER, M.; LISSOLO, T.; BOILEAU, H. Importance of heat transfer in an anaerobic digestion plant in a continental climate context. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 59-67, 2012.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z. D.; NASCIMENTO, V. M. G. D.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F.; BARBOSA, A. D. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2 , p. 213-234, 2011.

MOCKAITIS, G.; RATUSZNEI, S. M.; RODRIGUES, J. A.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. **Journal of Environmental Management**, v. 79, n. 2, p. 198-206, 2006.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MUGDHA, A.; USHA, M. Enzymatic treatment of wastewater containing dyestuffs using different delivery systems. **Chemical Communications - SciRev**, v. 2, n. 1, p. 31-40, 2012.

NATURALTEC. ETA/ETE. Disponível em: <http://www.naturaltec.com.br/eta-lava-rapido/>. Acesso em: 12 de Maio de 2019.

NASCIMENTO, C. S.; DOS SANTOS, V. L.; ANDRADE, M. H. C. **Análise da produção de protease e lipase por fungos filamentosos isolados do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lood. Exmart).** XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, 2014.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Microbial detergent compatible lipases. **Journal of Scientific & Industrial Research.** v. 74, p. 105-113, 2015.

OLIVEIRA, J. P.; ANTUNES, P. W. P.; PINOTTI, L. M.; CASSINI, S. T. A. Caracterização físico-química de resíduos oleosos do saneamento e dos óleos e graxas extraídos visando a conversão em biocombustíveis. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 597-602, 2014.

PERECIN, D.; CARGNELUTTI, A. Efeitos por comparações e por experimento em interações de experimentos fatoriais. **Ciência e Agrotecnologia.** v. 32, n. 1, p. 68-72, 2008.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; FURIGO JR., A. **Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola utilizando lipase de *Candida rugosa*.** XIV Simpósio Nacional de Fermentações – SINAFERM. Florianópolis, 2003.

PEREIRA, G. A.; RODRIGUES, E. P.; BARCELLOS, F. G. **Quantificação da atividade lipolítica de *Aureobasidium pullulans* isolados a partir da planta medicinal *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae).** V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina, 2015.

QUEIRÓS, Y. G. C.; CLARISSE, M. D.; OLIVEIRA, R. S.; REIS, B. D.; TRAVOLLONI, A. M. L.; LUCAS, E. F. **Determinação e correlação do teor total de óleos e graxas por meio de diferentes técnicas espectroscópicas e gravimétrica.** 3º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás. Salvador, 2005.

QUEIROZ, H. G. D. S.; NETA, N. D. A. S.; PINTO, R. S.; RODRIGUES, M. D. C. P.; COSTA, J. M.C. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de sorvetes do tipo tapioca. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, 2009.

RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**, Casa do Pão: Campinas, 326p., 2005.

RODRIGUES, J. G. C. Produção de lipase para aplicação no tratamento de efluentes provenientes de uma indústria de óleos lubrificantes rerrefinados. Aula de Qualificação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, 2019.

RODRIGUES, J. P.; ORRICO, A. C. A.; JUNIOR, M. A. P. O.; SENO, L. O.; ARAÚJO, L. C.; SILVA, N. S. Adição de óleo e lipase sobre a biodigestão anaeróbia de dejetos suínos. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 544-547, 2014.

ROMDHANE, I. B. B.; FENDRI, A.; GARGOURI, Y.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 1, p. 112-120, 2010.

ROSA, D. R. **Tratamento Enzimático/Biológico de Efluentes com Alto Teor de Gordura**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SANGEETHA, R.; ARULPANDI, I.; GEETHA, A. Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: An overview. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-24, 2011.

SANTOS, G. G. Sorvete: Processamento, tecnologia e substitutos de sacarose. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 95-109, 2009.

SERVIÇO AUTÔNOMO DE SANEAMENTO DE PELOTAS (SANEP). Disponível em: <http://server.pelotas.com.br/sanep/sobre-o-sanep/>. Acesso em: 12 de Maio de 2019.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 625258, 2014.

SHETE, B. S.; SHINKAR, N. P. Comparative study of various treatments for dairy industry wastewater. **IOSR Journal Engineering**, v. 3, n. 8, p. 42-47, 2013.

SILVA, D. A.; SANTOS, A. A.; BETTENCOURT, G. M.; ZANDONÁ FILHO, A.; RODRIGUES, M. L. F. **Aplicação de lipases fúngicas para a redução de óleos e graxas de efluentes de um abatedouro da região metropolitana de Curitiba**. Monografia (Tecnólogo em Bioprocessos e Biotecnologia). Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba, 2016.

SILVA, G. S.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F. **Seleção e imobilização de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

SILVA, M. A. **Produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* e formulação de bioproduto para aplicação em tratamento de efluente lácteo**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2016.

SILVA, T. A. R.; NETO, W. B. Estudo da redução da acidez do óleo residual para a produção de biodiesel utilizando planejamento fatorial fracionado. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 828-839, 2013.

SILVA, T. C. **Tratamento de efluente oleoso de biodiesel por extrato bruto de lipase fúngica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 121-139, 2009.

SOUZA, J. C. B.; COSTA, M. D. R.; RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI, K. Sorvete: composição, processamento e viabilidade da adição de probiótico. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 1, p. 155-165, 2010.

SPERLING, Marcos Von. **Princípio do tratamento biológico de águas residuárias**. 4. ed. Minas Gerais: UFMG, 2014.

TCHAMANGO, S.; NANSEU-NJIKI, C. P.; NGAMENI, E.; HADJIEV, D.; DARCHEN, A. treatment of dairy effluents by electrocoagulation using aluminium electrodes. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 4, p. 947-952, 2010.

TOMBINI, J. **Produção de lipase fúngica a partir de subprodutos do processamento de soja**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. The determination of chemical oxygen demand by semi-automated colorimetry – Method 410.4. Environmental monitoring systems laboratory office research and development. 1993. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/method_410-4_1993.pdf. Acesso em: 29 de maio de 2019.

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

VILELA, Mirian Lima. **Tratamento biológico do resíduo da indústria de sorvetes por Zygomycetes**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**, v. 219, n. 1-3, p. 190-202, 2008.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

ZANATTA, P.; GABRIEL, M.; LONGARETTI, G.; DALCANTON, F.; DAL MAGRO, J.; MELLO, J. M. M. Hidrólise enzimática de lipídeos presentes em efluentes. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2017.