

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVAGEM DO BODIESEL
DE ÓLEO DE SOJA POR MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE**

DAYANE CRISTINA DA ROCHA

CASCAVEL – PARANÁ - BRASIL
JUNHO – 2010

DAYANE CRISTINA DA ROCHA

**PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVAGEM DO BIODIESEL
DE ÓLEO DE SOJA POR MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração em **Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental**.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Martins Gomes

CASCADEL – PARANÁ - BRASIL

JUNHO – 2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus Cascavel– PR., Brasil)

R672p Rocha, Dayane Cristina da
Pré-tratamento biológico da água residuária de lavagem do biodiesel de óleo de soja por micro-organismos produtores de lipase./ Dayane Cristina da Rocha.- Cascavel, 2010.
55 p.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Martins Gomes

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2010

1. Biodegradação enzimática 2. Efluentes gordurosos. 3. Atividade lipolítica. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 660.6
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo CRB-9ª/965

DAYANE CRISTINA DA ROCHA

**PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVAGEM DO
BODIESEL DE ÓLEO DE SOJA POR MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Benedito Martins Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE - Cascavel

Profa. Dra. Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE - Cascavel

Prof. Dr. Fernando Hermes Passig

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR - Campo Mourão

Cascavel, 05 de julho de 2010

BIOGRAFIA

DAYANE CRISTINA DA ROCHA, filha de Genésio Alves da Rocha e Vera Lucia Bandeira da Rocha, nascida em Presidente Prudente, SP, em 13 de Junho de 1986.

Formada em Tecnologia em Gerenciamento Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, PR, em 2007.

Ingressou em 2008 no curso de mestrado de Engenharia Agrícola, na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, bolsista CAPES, sob orientação do professor Dr. Benedito Martins Gomes.

Atualmente é funcionária da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), atuando no Núcleo de Gestão Ambiental da Unidade de Negócio do Vale do Ribeira.

"Acredita no melhor ... tem um objetivo para o melhor, nunca fiques satisfeito com menos que o teu melhor, dá o teu melhor, e no longo prazo as coisas correrão pelo melhor."
Henry Ford

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, que me iluminou e abençoou durante toda esta trajetória, me dando sabedoria e me guiando.

*Dedico a minha família,
em especial aos meus pais Genésio Alves da Rocha e Vera Lucia Bandeira da Rocha,
pela confiança e pelo incentivo que sempre me deram,
acreditando em minha capacidade e estando sempre ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Benedito Martins Gomes, pela orientação e confiança que apresentou em mim e em meu trabalho, durante o curso de mestrado.

Agradeço às professoras Simone Damasceno Gomes e Luciane Sene, por suas ajudas, colaborações, ensinamentos compartilhados e disponibilidade, auxiliando-me sempre que solicitado.

Meus agradecimentos, também, a todos os demais professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola (PGEAGRI) que, direta ou indiretamente, participaram da minha formação.

Aos meus colegas do RHESA, pelas experiências compartilhadas e, principalmente, as minhas amigas Eliane Hermes, Dilcemara Cristina Zenatti e Káthia Kunzler, Dinéia Tessaro e Cris Kreutz, que sempre estiveram por perto na hora da alegria e das dificuldades.

À CAPES, pelo fomento da bolsa de estudos durante os dois anos do curso de mestrado.

Ao PGEAGRI/UNIOESTE, pelo apoio no desenvolvimento do projeto, viabilizando a sua realização.

PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE LAVAGEM DO BIODIESEL DE ÓLEO DE SOJA POR MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE

RESUMO

O biodiesel é um combustível derivado de biomassa renovável que pode substituir, parcial ou totalmente, o combustível de origem fóssil. O processo de produção de biodiesel é composto das seguintes etapas: preparação da matéria-prima, reação de transesterificação, separação de fases, recuperação e desidratação do álcool, destilação da glicerina e purificação desse combustível renovável, tendo como subproduto a glicerina e como resíduo água de purificação. A água residuária, formada durante a etapa de purificação, apresenta alto teor de óleos e graxas, tendo potencial para contaminar corpos água. Uma das propostas de tratamento deste resíduo é a utilização de hidrólise enzimática por lipases para remoção de óleos e graxas. Devido à especificidade das lipases e sua ampla aplicação tecnológica, verifica-se que é necessário pesquisar novas cepas de micro-organismos produtores desta enzima, com características específicas do resíduo em estudo. Deste modo, teve-se por objetivo neste estudo avaliar a biodegradação da água de lavagem (purificação) do biodiesel, obtido por transesterificação entre óleo de soja e metanol, por meio de produção de lipase, utilizando micro-organismos isolados do próprio resíduo. Para tanto, foram feitas análises das características físico-químicas iniciais da água residuária da lavagem do biodiesel e a partir desse resíduo foram isolados e selecionados micro-organismos com potencial de produção de lipase. Em seguida, foi feito um ensaio de biodegradação de gordura, fixando-se as variáveis: pH (5,95), temperatura (35°C), rotação (180 rpm) e concentração de nitrogênio (3 g.L⁻¹) e tendo como variáveis os micro-organismos pré-selecionados e o tempo (24, 48, 72, 96 e 120 h). Com o tempo (48h) e o micro-organismo *Klebsilla oxytoca*, iniciou-se o processo de otimização da remoção de gordura no tratamento da água residuária. Para tal, utilizou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), tendo como variáveis independentes pH e concentração de nitrogênio; as demais variáveis foram previamente fixadas em: temperatura 35°C, rotação 180 rpm e tempo 48 h. Para validação experimental do modelo proposto para remoção de gordura foi realizado, em triplicata, um ensaio de biodegradação nas condições ótimas estabelecidas. Estes resultados, por sua vez, foram comparados com uma cinética realizada nas mesmas condições, mas utilizando como inóculo o produto comercial Hábil FTW SF. A água residuária de purificação do biodiesel apresentou alto potencial de impacto ambiental, tendo uma concentração de O&G de 6,76 g.L⁻¹. Das seis culturas microbianas isoladas do tanque decantação deste efluente, dois micro-organismos (A e B) foram selecionados, apresentando um alto potencial de produção de lipase, com índice enzimático de 0,56 e 0,57, respectivamente. Por meio do DCCR, conclui-se que o ponto ótimo para máxima eficiência de remoção de O&G da água residuária de purificação do biodiesel foi equivalente ao pH 7,5 e 4,00 g.L⁻¹ de nitrogênio, obtendo-se uma eficiência de 60% na remoção de gordura. O tratamento da água residuária utilizando o micro-organismo isolado *Klebsilla oxytoca*, a partir do próprio efluente, não se diferenciou dos ensaios realizados utilizando o produto comercial Hábil FTW SF.

Palavras-chave: biodegradação enzimática; efluentes gordurosos; atividade lipolítica.

BIOLOGICAL PRE-TREATMENT OF SOYBEAN OIL BIODIESEL WASTEWATER WASHING BY LIPASE PRODUCING MICROORGANISM

ABSTRACT

Biodiesel is a derived fuel from renewable biomass that can substitute partially or totally the fossil fuel. The production process of the biodiesel is composed by the following stages: raw material preparation, transesterification reaction, phases separation, alcohol recovery and dehydration, glycerin distillation and purification of the renewable fuel, resulting in glycerin as a by-product and purification wastewater. The formed wastewater during the stage of purification presents high concentration of oils and greases, presenting potential to contaminate bodies of water. One of the treatment proposals of this residue is the enzymatic hydrolysis use by lipases for removal of oils and greases. Due the specificity of lipases and its large technological application, it appears that it is necessary to search new microorganisms producers of this enzyme, with specific characteristics to the residue in study. Therefore, its objective was to evaluate the biodegradation of the biodiesel washing (purification) water, gotten through transesterification between soy oil and methanol, by means of production of lipase, using isolated microorganisms from the proper residue. For both, analyses of the initial physico-chemical characteristics had been made with the residuary water of the biodiesel washing, then it had been isolated and chosen, by means of determinations of the lipase activity. Following, it was made a test of fat biodegradation, fixing the variables pH (5,95), temperature (35°C), rotation (180 rpm) and nitrogen concentration (3 g.L⁻¹) and establishing as variable the two microorganism preselected and the time (24, 48, 72, 96 and 120 h). At the time (48 h) and *Klebsiella oxytoca* microorganism defined, the optimization process of the fat removal in the treatment of the wastewater was initialized. For such, it was used a designed central composite (DCCR), establishing as independent variables pH and nitrogen concentration, the other variable ones had been previously fixed in: temperature 35°C, rotation 180 rpm and 48 hours. For experimental validation of the model considered for fat removal it was carried through, in triplicate copy, a biodegradation test in the excellent established conditions. These results, on the other hand, had been compared to a kinetics one carried through the same conditions, but using as inoculum the commercial product Hábil FTW SF. The biodiesel purification wastewater had presented high potential of environmental impact, presenting a concentration of O&G of 6,76 g.L⁻¹. From the six isolated microbiological cultures in the decantation tank of this effluent one, two microorganisms (A and B) had been selected presenting one high potential of lipase production, with enzymatic index of 0,56 and 0,57, respectively. Through DCCR ways it has been concluded that the best point to the maximum efficiency of removal of O&G from the residuary water of biodiesel purification was equivalent to pH 7,5 and 4,00 g.L⁻¹ of nitrogen, resulting in an efficiency of 60% in the removal of fat. The treatment of the wastewater using the proper isolated microorganism from the effluent (*Klebsiella oxytoca*) was not differentiated from the carried through essays using the commercial product Hábil FTW SF.

Key words: enzymatic degradation; fatty effluent; lipolytical activity.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xii
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo geral	3
2.2	Objetivos específicos.....	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Biodiesel.....	4
3.2	Produção do Biodiesel.....	6
3.2.1	Matéria-prima	6
3.2.1.1	Soja	9
3.2.2	Etanol <i>versus</i> metanol	10
3.2.3	Transesterificação	10
3.2.4	Separação de fases.....	12
3.2.5	Recuperação do álcool, da glicerina e dos ésteres	12
3.2.6	Purificação.....	12
3.3	Tratamento de efluente com alto teor de gordura	14
3.4	Lipase.....	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Coleta e Armazenagem da Água Residuária	20
4.2	Caracterização da Água Residuária.....	21
4.3	Isolamento dos Micro-organismos	21
4.4	Seleção dos Micro-organismos.....	22
4.4.1	Determinação da atividade lipolítica.....	23
4.5	Preparo para Ensaio de Degradação de Lipídios	23
4.5.1	Preparo do inóculo.....	23
4.5.2	Preparo do substrato	24
4.5.2.1	Determinação do teor de ácidos livres	24
4.5.2.2	Determinação da atividade lipásica	24

4.5.2.3	Determinação do teor óleos e graxas	25
4.6	Ensaio Inicial de Degradação de Lipídios	26
4.7	Identificação dos Micro-organismos.....	26
4.8	Otimização do Processo de Remoção de Gordura	26
4.9	Ensaio Final de Degradação de Lipídios.....	27
4.10	Análise estatística dos dados	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	Caracterização do Resíduo	29
5.2	Seleção dos Micro-organismos.....	30
5.3	Ensaio Inicial de Degradação de Lipídios	32
5.4	Identificação do Micro-organismo	36
5.5	Otimização do Processo de Remoção de Gordura	37
5.6	Ensaio Final de Degradação de Lipídios.....	43
6	CONCLUSÕES	48
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características de algumas oleaginosas com potencial para obtenção do biodiesel	6
Tabela 2	Composição de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais (%).....	7
Tabela 3	Composição de ácidos graxos do óleo de soja	9
Tabela 4	Enzimas com potenciais aplicações em tratamento de efluentes.....	15
Tabela 5	Parâmetros que foram realizados para caracterização do resíduo	21
Tabela 6	Composição do meio de cultura de isolamento dos micro-organismos.....	21
Tabela 7	Valores codificados e reais do delineamento experimental (DCCR)	27
Tabela 8	Valores codificados e reais na 2º rodada do DCCR.....	27
Tabela 9	Caracterização inicial da água de purificação do biodiesel	29
Tabela 10	Média do índice enzimático (IE) encontrado para cada micro-organismo, baseado na relação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia+halo .	30
Tabela 11	Análise de variância (ANOVA) para o teor de O&G	32
Tabela 12	Média dos parâmetros avaliados para os micro-organismos A e B no tempo de 24 a 120 h	35
Tabela 13	Matriz do primeiro planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto a pH, remoção de O&G, remoção de DQO, acidez e atividade lipásica	37
Tabela 14	Matriz do segundo planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto a pH, remoção de O&G, remoção de DQO, acidez e atividade lipásica	40
Tabela 15	Média dos parâmetros avaliados para o micro-organismo <i>Klebsiella oxytoca</i> e o Produto comercial no tempo de 12 a 96 h	44
Tabela 16	Análise de variância (ANOVA) para o teor de O&G	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Evolução do uso do biodiesel no Brasil.....	5
Figura 2	Volume de biodiesel produzido no Brasil nos últimos anos. – 2005-2010.....	5
Figura 3	Potencialidade brasileira na produção de oleaginosa em cada região.....	7
Figura 4	Percentual de matéria-prima utilizada na produção de biodiesel.	8
Figura 5	Reações envolvidas na transesterificação de triglicerídeos.	11
Figura 6	Fluxograma do processo de produção de biodiesel.	13
Figura 7	Tanque de retenção de gordura.....	20
Figura 8	Estrias realizadas em placa de Petri pelo método <i>streak-plate</i>	22
Figura 9	Fotos ilustrativas das cepas isoladas, à esquerda (micro-organismo B) com e à direita (micro-organismo F) sem halo de degradação.	30
Figura 10	Média \pm 95% IC para valores de índice enzimático obtidos pelos diferentes micro-organismos.	31
Figura 11	Cinética da redução do teor de O&G.	33
Figura 12	Imagem ilustrativa de bacilos Gram negativos.....	36
Figura 13	Foto da colônia isolada de <i>Klebsiella oxytoca</i> (Flugge 1886) Lautrop 1956.	37
Figura 14	Diagrama de Pareto para eficiência de remoção de gordura	38
Figura 15	Gráfico de superfície de resposta obtido com os dados de eficiências de remoção de O&G, avaliando as variáveis pH e concentração de nitrogênio.	39
Figura 16	Gráfico de contorno obtido com os dados de eficiências de remoção de O&G, avaliando as variáveis pH e concentração de nitrogênio.....	39
Figura 17	Diagrama de Pareto para eficiência de remoção de gordura (2º DCCR).....	41
Figura 18	Gráfico de superfície de resposta da eficiências de remoção de O&G, avaliando as variáveis pH e concentração de nitrogênio (2º DCCR).	41
Figura 19	Gráfico de contorno obtido com os dados de eficiências de remoção de O&G, avaliando as variáveis pH e concentração de nitrogênio (2º DCCR).....	42
Figura 20	Perfil de desejabilidade para determinação do ponto ótimo de remoção de O&G da água residuária de purificação de biodiesel.	43
Figura 21	Cinética final da redução do teor de O&G.....	45

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DQO	Demanda química de oxigênio
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FES	Fermentação no estado sólido
H₂O	Água
IE	Índice enzimático
N	Normalidade
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NTK	Nitrogênio total kjeldahl
O&G	Óleos e graxas
p/v	Peso por volume
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
v/v	Volume por volume

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos insumos energéticos consumidos é fornecida por fontes não renováveis e poluentes, como o petróleo, gás natural e carvão mineral. Com o aumento do consumo de energia, decorrente do desenvolvimento tecnológico, gerou-se a necessidade de busca por tecnologias limpas, com fontes energéticas alternativas renováveis e menos impactantes ao ambiente. Neste sentido, os óleos vegetais e a gordura animal vêm sendo estudados como fontes renováveis em potencial para a produção de biocombustíveis, que podem ser usados em substituição ao diesel de petróleo.

No Brasil, devido à grande diversidade de espécies oleaginosas, pode-se produzir biodiesel a partir de diferentes óleos vegetais como soja, milho, amendoim, algodão, girassol, mamona, dendê, babaçu e palma. Esse biocombustível pode ser produzido também a partir de óleos de frituras e de sebo bovino, reduzindo, assim, os riscos de poluição ambiental causados por esses materiais.

O processo de transesterificação é o mais frequentemente utilizado para produção de biodiesel. Este processo consiste na reação química de óleos vegetais ou de gordura animal com o álcool, etanol ou metanol, na presença de um catalisador básico, ácido ou enzimático.

Apesar de diversas vantagens socioambientais trazidas pela abertura do mercado para o biodiesel, o aumento da produção desse biocombustível acarreta também o aumento de efluente gerado durante o seu processo de purificação.

Durante a etapa de purificação do biodiesel, há a formação de água residuária com alto teor de óleos e graxas, os quais têm potencial para contaminar corpos d'água, prejudicando o equilíbrio necessário à manutenção do ecossistema aquático.

Como existem vários problemas de tratamento em efluentes com elevados teores de óleos e graxas, pesquisas em pré-tratamentos para remoção das gorduras estão sendo realizadas. Uma das propostas é a utilização de hidrólise enzimática por lipases, para remoção de óleos e graxas destes efluentes.

A lipase (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) é responsável pela catálise de reações que envolvem hidrólise e síntese de éster a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeia longa, fazendo com que sejam consideradas como um importante grupo de biocatalisadores, ocorrendo sua atuação na interface óleo-água (CASTRO & ANDERSON, 1995).

Vários fatores influenciam a síntese de lipase pelos micro-organismos, dentre eles destacam-se a temperatura de incubação, o pH do meio e o inóculo. Devido à especificidade das lipases e sua ampla aplicação tecnológica, verifica-se que é necessário pesquisar novas

cepas de micro-organismos produtores, com características específicas do resíduo em estudo.

Para aumentar a competitividade dos processos biotecnológicos é necessária a aplicação de metodologias operacionais capazes de assegurar, de modo estável e reprodutível, uma produtividade máxima com um mínimo de custos. O planejamento e otimização de processos são etapas determinantes para a obtenção de resultados satisfatórios e de alta confiabilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a biodegradação da água de lavagem (purificação) do biodiesel, obtido por transesterificação entre óleo de soja e metanol, por meio de micro-organismos produtores de lipase isolados a partir do próprio resíduo.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a água de lavagem do biodiesel, quanto às suas características físico-químicas;
- Isolar micro-organismos com potencial de degradação do resíduo em estudo;
- Identificar o melhor micro-organismo e o tempo reação de biodegradação da água de lavagem do biodiesel;
- Otimizar o tratamento de remoção de óleos e graxas do efluente;
- Comparar a eficiência do tratamento entre o micro-organismo selecionado e um produto comercial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiesel

A alta demanda de energia no mundo industrializado e no setor doméstico e os problemas de poluição causados, devido ao vasto uso de combustíveis de origem fóssil, têm resultado em uma crescente necessidade de desenvolver fontes de energias renováveis sem limites de duração e de menor impacto ambiental que os meios tradicionais existentes, estimulando, assim, recentes interesses na busca de fontes alternativas para os combustíveis à base de petróleo (GERIS *et al.*, 2007).

O biodiesel é definido pela Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, como combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2010).

Quimicamente, é definido como éter monoalquílico de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrências naturais e pode ser produzido, juntamente com a glicerina, pela reação de trigliceróis (triglicerídeos) com etanol ou metanol, na presença de um catalisador ácido ou básico (RAMOS *et al.*, 2003).

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, lançado em 6 de dezembro de 2004 pelo Governo Federal, apoia-se na crescente demanda por combustíveis de fontes renováveis e no potencial brasileiro para atender parte expressiva dessas necessidades. Este programa tem como objetivos gerar empregos e renda na agricultura familiar, contribuir para a economia e reduzir disparidades regionais e melhorar as condições ambientais.

Desde 1 de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009, que aumentou de 4% para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel (ANP, 2010).

A Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, introduz o biodiesel na matriz energética brasileira e estabelece um percentual mínimo obrigatório de 5%, em volume, de adição de biodiesel ao óleo diesel, a ser atingido em oito anos. A lei preconiza que se utilize, após três anos dessa publicação, um percentual mínimo obrigatório de 2%, em volume (ACCARINI, 2006). Na Figura 1 visualiza-se a evolução do uso do biodiesel no Brasil até 2009.

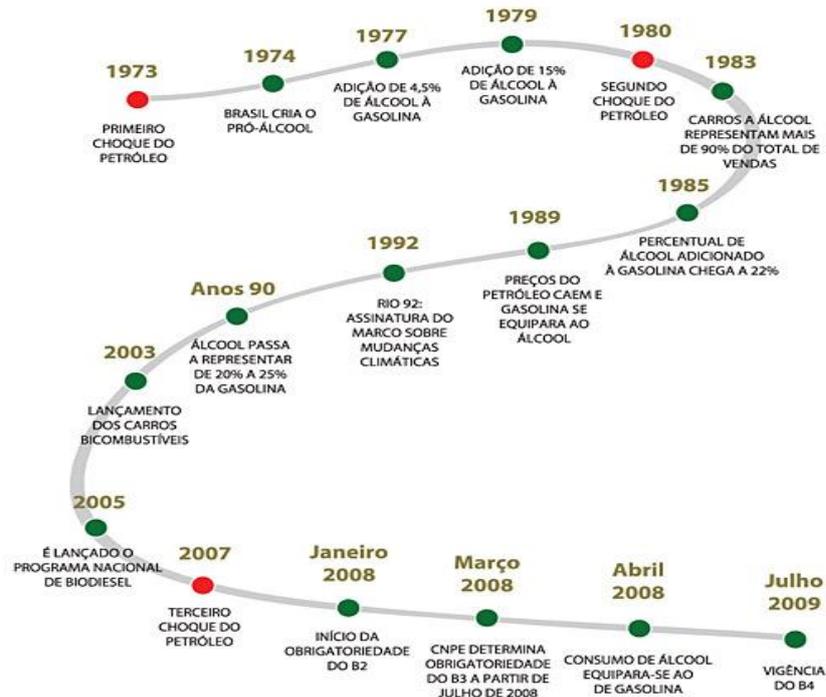


Figura 1 Evolução do uso do biodiesel no Brasil.

Fonte: ANP (2010).

O aumento da porcentagem obrigatória de biodiesel no diesel comercial tem determinado a elevação da produção nacional (Figura 2), chegando em 2009 a uma produção de mais de 1.600.000 m³ do biocombustível, sendo o Paraná produtor de 23.681 m³, por meio de suas 3 usinas autorizadas pela ANP, de um total de 65 usinas autorizadas no Brasil. Destas usinas a maior parte se concentra na região centro-oeste, seguida pelo sudeste, sul, nordeste e, o menor produtor, a região norte (ANP, 2010).

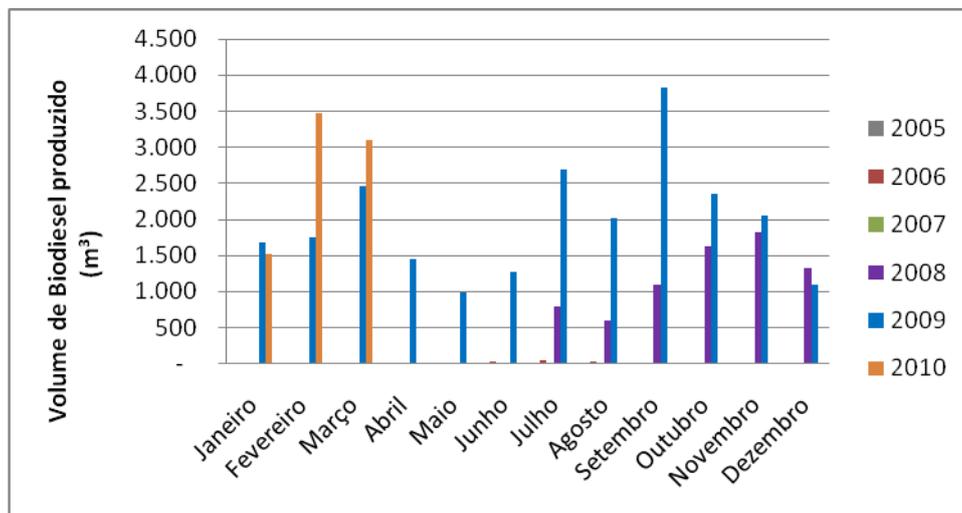


Figura 2 Volume de biodiesel produzido no Brasil – 2005-2010.

Fonte: ANP (2010).

A implantação do biocombustível na matriz energética brasileira traz uma série de vantagens ambientais, econômicas e sociais. Além de fornecer um mercado para a produção adicional dos óleos vegetais e das gorduras animais e diminuir a dependência do petróleo importado, o biodiesel gera menos poluição ambiental, ou seja, contribui muito menos ao aquecimento global do que os combustíveis fósseis (GERPEN, 2005).

Há muitos problemas associados com o uso de óleos vegetais diretamente nos motores diesel, como: diminuição da potência e eficiência térmica dos motores; formação de depósitos de carbono; espessamento ou gelificação dos óleos lubrificantes como resultados da contaminação por óleos vegetais; alta viscosidade e baixa volatilidade o que resulta em deposição de carbono em motores, devidos à combustão incompleta (PINTO *et al.*, 2005). Algumas modificações químicas e físicas devem ser testadas para acabar com esses problemas, como: pirólises, microemulsificação, diluição e transesterificação.

3.2 Produção do Biodiesel

A seguir são apresentadas as etapas principais do processo de produção do biodiesel, até a formação da água de purificação, efluente da produção do biocombustível.

3.2.1 Matéria-prima

As fontes de produção de biodiesel devem cumprir dois requisitos: baixo custo e grande escala de produção. Diante de toda diversidade de oleaginosas promissoras para a produção do biodiesel no Brasil, para eleger uma fonte para a produção de biodiesel é necessário considerar suas reais potencialidades tecnológicas, econômicas e agrícolas, levando em consideração as características da regionalização, como sazonalidade e escala periódica, características físicas e químicas, percentagem de óleo na planta e rendimento de óleo por hectare (Tabela 1) (PINTO *et al.*, 2005; CANDEIA, 2008).

Tabela 1 Características de algumas oleaginosas com potencial para obtenção do biodiesel

Espécie	Origem do óleo	Meses de colheita	Rendimento em óleo (t/ha)
Dendê (<i>Elaeis guineensis</i> N.)	Amêndoa	12	3,0 - 6,0
Babaçu (<i>Attalea speciosa</i> M.)	Amêndoa	12	0,4 - 0,8
Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	Grão	3	0,5 - 1,5
Colza (<i>Brassica campestris</i>)	Grão	3	0,5 - 0,9
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	Grão	3	0,5 - 1,0
Amendoim (<i>Arachis hipogaea</i>)	Grão	3	0,6 - 0,8
Soja (<i>Glycine max</i>)	Grão	3	0,2 - 0,6

Fonte: CANDEIA (2008).

No Brasil, a produção de biodiesel foi adaptada para as culturas disponíveis em cada região (Figura 4). As fontes mais utilizadas são: no Norte: dendê e soja; no Nordeste: mamona, dendê, babaçu, soja e caroço de algodão; na Região Centro-Oeste: soja, semente de algodão, mamona e girassol; no Sudeste: soja, mamona, algodão e semente de girassol; no Sul: semente de girassol, soja, canola e semente de algodão (PINTO *et al.*, 2005).

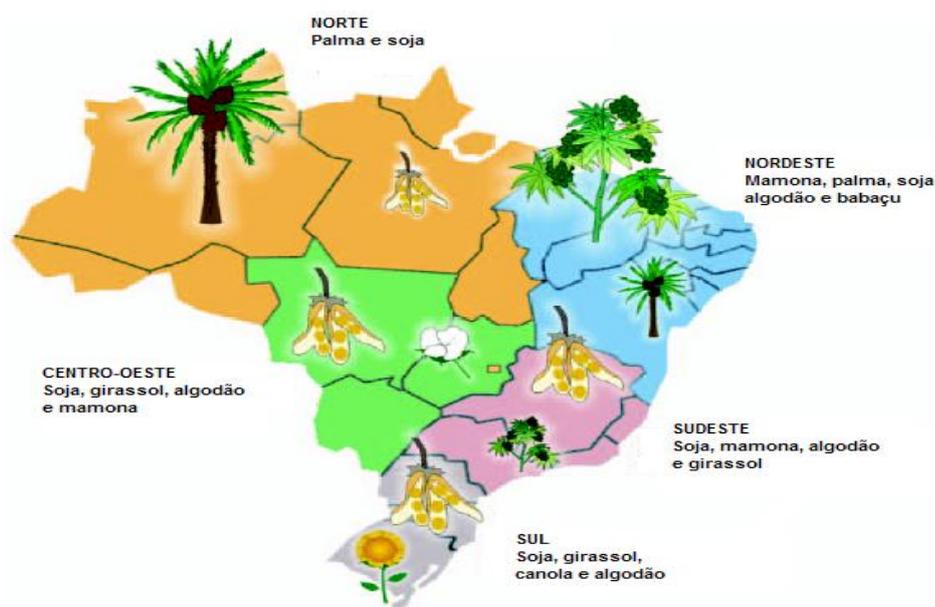


Figura 3 Potencialidade brasileira na produção de oleaginosas em cada região.

Fonte: adaptado de PINTO *et al.* (2005).

Do ponto de vista químico, óleos de diferentes fontes têm diferentes composições de ácidos graxos (Tabela 2), em relação ao tamanho da cadeia, da posição da insaturação ou presença de outras funções químicas (PINTO *et al.*, 2005).

Tabela 2 Composição de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais (%)

Óleo vegetal	Palmitico 16:0	Esteárico 18:0	Palmitoleico 16:1	Oleico 18:1	Linoleico 18:2	Ricinico 12-OH-oleico	Outros ácidos
Sebo	29,0	24,5	-	44,5	-	-	-
Óleo de coco	5,0	3,0	-	6,0	-	-	65,0
Óleo de oliva	14,6	-	-	75,4	10,0	-	-
Óleo amendoim	8,5	6,0	-	51,6	26,0	-	-
Óleo de algodão	28,6	0,9	0,1	13,0	57,2	-	0,2
Óleo de milho	6,0	2,0	-	44,0	48,0	-	-
Óleo de soja	11,0	2,0	-	20,0	64,0	-	3,0
Amêndoa de avelã	4,9	2,6	0,2	81,4	10,5	-	0,3
Semente de papoula	12,6	4,0	0,1	22,3	60,2	-	0,8
Colza	3,5	0,9	0,1	54,1	22,3	-	9,1
Semente de cártamo	7,3	1,9	0,1	13,5	77,0	-	0,2
Semente de girassol	6,4	2,9	0,1	17,7	72,8	-	0,1
Óleo de mamona	-	3,0	3,0	3,0	1,2	89,5	0,3

Fonte: PINTO *et al.* (2005).

No Brasil, o óleo de soja é uma fonte que já possui uma alta escala de produção de biodiesel (PINTO *et al.*, 2005) (Figura 4). No entanto, outras fontes, como: girassol, amendoim, algodão, óleo de palma, coco, babaçu e óleo de mamona, podem ser usados. Além das plantas oleaginosas, as gorduras animais (sebo bovino, óleo de peixe, óleo de mocotó, banha de porco, entre outras), os óleos usados (frituras de alimentos) e as gorduras residuais (os esgotos ricos em matéria graxa, possível de extraírem-se óleos e gorduras; águas residuais de processos de indústrias de alimentos, como as de pescados, couro etc.), também apresentam potencial para produção do biodiesel.



Figura 4 Percentual de matéria-prima utilizada na produção de biodiesel.

Fonte: ANP (2010).

LEE, FOGLIA & CHANG (2002) desenvolveram estudos sobre a produção de biodiesel a partir de gordura animal e gorduras resultantes dos processos de fritura. A gordura animal foi, inicialmente, fracionada para a separação dos ácidos graxos saturados, que resultam em ésteres metílicos sujeitos a problemas de desempenho, a baixas temperaturas. A gordura, cujos compostos polares foram previamente separados, quando utilizada na reação, proporciona rendimento de 96%, enquanto que esta reação realizada com gordura com altos teores de componentes polares apresentou, um rendimento de apenas 25%. Estes resultados confirmam que a presença de produtos da degradação de óleos e gorduras, como ácidos graxos livres e outros compostos polares, produzidos no processo de fritura, impedem a reação de alcoólise para a produção de ésteres metílicos ou etílicos (LEE; FOGLIA & CHANG, 2002).

3.2.1.1 Soja

A soja (*Glycine max*) é uma planta pertencente à família Leguminosae, possui excelente capacidade de adaptação, podendo ainda ser semeada duas vezes ao ano (setembro-outubro e fevereiro-março). O grão possui textura macia, sabor pouco amargo, elevados teores de ácido ascórbico e β -Caroteno e baixas quantidades de fatores antinutricionais, com 17-19% de proteínas e 35-40% de gordura (SIMONNE *et al.*, 2000; EMBRAPA SOJA, 2007).

Cerca de 99% dos triacilglicerídeos, presentes no óleo de soja, são compostos pelos ácidos graxos: esteárico, linolênico, palmítico, oléico e linoléico (COSTA NETO *et al.*, 2000), (Tabela 3). Além disso, ainda existem pequenas quantidades de componentes não-glicerídicos, tais como: fitoesteróis, ceras, hidrocarbonetos, carotenóides, tocoferóis e fosfatídeos (CANDEIA, 2008).

Tabela 3 Composição de ácidos graxos do óleo de soja

Ácidos Graxos Saturados	Nº de Carbonos	Concentração (%)
Láurico	C 12:0	0,1 (máx.)
Mirístico	C 14:0	0,2 (máx.)
Palmítico	C 16:0	9,9 - 12,2
Esteárico	C 18:0	3 - 5,4
Araquídico	C 20:0	0,2 - 0,5
Behênico	C 22:0	0,3 - 0,7
Lignocérico	C 24:0	0,4 (máx.)
Ácidos Graxos Insaturados	Nº de Carbonos	Concentração (%)
Palmitoléico	C 16:1	Traços - 0,2
Oléico	C 18:1	17,7 - 26
Linoléico	C 18:2	49,7 - 56,9
Linolênico	C 18:3	5,5 - 9,5
Gadolêico	C 20:1	0,1 - 0,3
Erúcido	C 22:1	0,3 (máx.)

Fonte: CANDEIA (2008).

A produção de soja vem crescendo muito nos últimos anos. Atualmente, é a única oleaginosa com escala produtiva suficiente para produzir de imediato biocombustível. Apesar da produção da soja ser abundante, o nível atual de suprimento ainda não a torna apta a fornecer o volume de óleo suficiente para abastecer o novo segmento do mercado com produção do biodiesel (CANDEIA, 2008; FREITAS, 2004). As sementes de soja, por causa das grandes áreas da agricultura, proporcionam excelentes opções para a expansão da produção de óleo vegetal no Brasil.

3.2.2 Etanol versus metanol

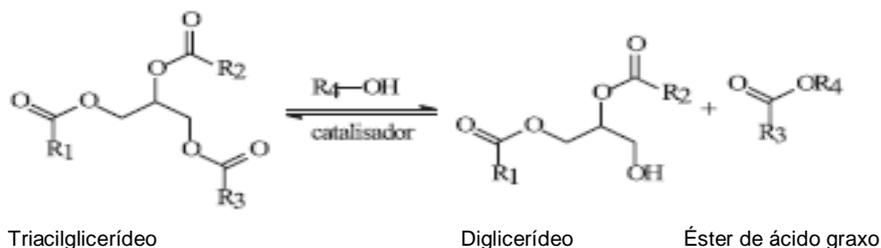
Os alcoóis mais utilizados na produção do biodiesel são os de cadeia curta (metanol, etanol, propano e butanol), com destaque para o metanol, devido às facilidades cinéticas que proporciona à reação. A alcoólise com metanol é tecnicamente mais viável do que a alcoólise com etanol (COSTA NETO *et al.*, 2000; WUST, 2004; OLIVEIRA, 2004). O etanol pode ser utilizado desde que anidro (com teor de água inferior a 1%), visto que a água atua como inibidor da reação. Entretanto, o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de álcool etílico oriundo da biomassa e este é um fator que estimula estudos do seu uso em substituição ao metanol, pois, dessa maneira, o processo torna-se totalmente independente do petróleo (FERRARI; OLIVEIRA & SCABIO, 2005). Assim, os custos diferenciais de fretes, para o abastecimento de etanol *versus* abastecimento de metanol, em certas situações, podem influenciar na tomada de decisão (BARROS; WUST & MEIER, 2008).

3.2.3 Transesterificação

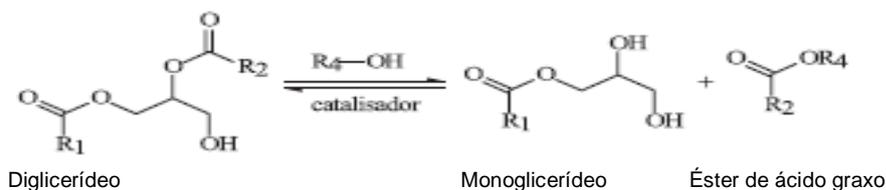
A reação de transesterificação, um dos meios mais utilizados para a produção do biodiesel, é um termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas em que um éster é transformado em outro, pela troca do resíduo alcoxila. Quando o éster original reage com um álcool, o processo de transesterificação é denominado alcoólise. Esta reação é reversível e prossegue essencialmente misturando os reagentes (GERIS *et al.*, 2007). Contudo, a presença de um catalisador (ácido ou base) acelera consideravelmente esta conversão, como também contribui para aumentar o seu rendimento (PINTO *et al.*, 2005).

Na transesterificação de óleos vegetais, é promovida a quebra da molécula do triacilglicerídeo, por uma sequência de três reações reversíveis e consecutivas, em que os monoglicerídeos e os diglicerídeos são os intermediários (Figura 5). Inicialmente, a molécula de triacilglicerídeo é convertida em diglicerídeo, depois em monoglicerídeo e, finalmente, em glicerol, produzindo um mol de éster a cada etapa reacional e liberando a glicerina como coproduto (ZHANG *et al.*, 2003). Apesar da estequiometria geral da equação requerer três mols do monoálcool para cada mol de triglicerídeo, a reversibilidade das reações exige um excesso de álcool no meio reacional, para promover um aumento no rendimento em monoálcoois.

1ª Etapa:



2ª Etapa:



3ª Etapa:

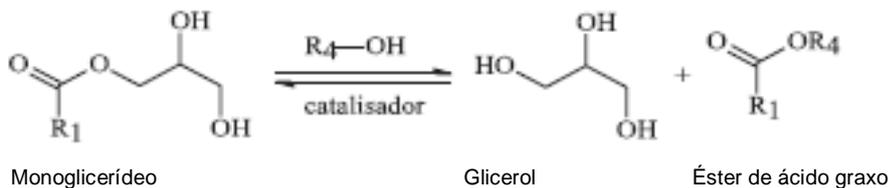


Figura 5 Reações envolvidas na transesterificação de triglicerídeos.

Fonte: SUAREZ *et al.* (2007).

A transesterificação é um processo que reduz o peso molecular para 1/3, em relação aos triglicerídeos, reduz a viscosidade e melhora a volatilidade do produto. Após a reação, os produtos resultantes são uma mistura de ésteres de ácidos graxos, glicerol, álcool, catalisador e uma pequena porcentagem de tri-, di- e monoglicerídeos (PINTO *et al.*, 2005).

A transesterificação é afetada pelo álcool, razão molar do óleo, catalisador, temperatura, tempo de reação, teor de água e ácidos livres. Esta é uma etapa chave e muito importante para produzir um combustível, de óleos vegetais, limpo e ambientalmente seguro (MEHER; SAGAR & NAIK, 2006).

As propriedades do biodiesel são fortemente influenciadas pelas propriedades individuais de ésteres graxos. Após a produção, o biocombustível deve ter características similares ao combustível fóssil e, em caso de não atender a essas especificações, deve ser reprocessado. A fim de assegurar a pureza do produto, evitar danos ao motor e ao ambiente, os níveis de ácidos graxos livres, álcool, água e glicerina devem ser minimizados (PINTO *et al.*, 2005).

3.2.4 Separação de fases

Segundo UCHIMURA (2006), após a produção do biodiesel, formam-se duas fases, uma leve (composta por ésteres etílicos ou metílicos = biodiesel) e uma fase pesada (predominantemente glicerina). Para DASARI *et al.* (2005), o glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, correspondendo a, aproximadamente, 10% do volume total de biodiesel produzido.

A separação de fases é uma etapa importante da produção de biodiesel. O processo de refino dos produtos decorrentes da sua produção pode ser tecnicamente difícil e elevar substancialmente os custos de produção. A pureza do biodiesel deve ser alta e de acordo com especificações próprias. A eficiência dessa separação irá depender da tecnologia empregada nessa etapa e da eficiência do processo anterior, podendo serem utilizados tanto processos de decantação, nos quais se considera a diferença de densidade entre os produtos, quanto de centrifugação que, em geral, é mais rápido e apresenta melhores resultados.

3.2.5 Recuperação do álcool, da glicerina e dos ésteres

Para a remoção do álcool residual da glicerina pode ser utilizado o processo de destilação, eliminando-se da glicerina bruta os constituintes voláteis, cujos vapores são liquefeitos num condensador apropriado. A glicerina bruta, emergente do processo, mesmo com suas impurezas convencionais, já constitui um coproduto vendável. O álcool residual é recuperado da fase mais leve (biodiesel) da mesma forma, liberando para as etapas seguintes os ésteres metílicos ou etílicos (CHRISTOFF, 2006).

3.2.6 Purificação

Conforme exemplificado no fluxograma simplificado do processo de produção de biodiesel, por meio da reação de transesterificação de óleos vegetais e gordura (Figura 6), após a separação de fases é necessária a purificação do biodiesel, durante esta etapa, retiram-se resíduos de glicerina, sabões e ácidos graxos. O método mais simples de se fazer a purificação é a lavagem com água. Praticamente todas as impurezas do biodiesel são solúveis em água e o biodiesel é muito pouco solúvel nela. Então, uma fração de água é adicionada ao biodiesel sob agitação e, posteriormente, separada. Este processo é seguido por filtração e secagem do biodiesel. Assim, as águas de lavagem contêm basicamente resíduos de sabões de sódio ou potássio, além dos ácidos graxos e glicerina. Esse biodiesel

deve ter suas características enquadradas nas especificações das normas técnicas estabelecidas para esse biocombustível, como combustível para uso em motores do ciclo diesel, que atende aos parâmetros fixados pela Portaria nº 255/03, de 15 de setembro de 2003 da Agência Nacional do Petróleo (CHRISTOFF, 2006).

Nesta fase do processo de produção, durante a etapa de purificação do biodiesel, a água residuária formada apresenta alto teor de óleos e graxas, os quais têm potencial para contaminar corpos d'água, prejudicando o equilíbrio necessário à manutenção do ecossistema aquático.

A água residuária de purificação de biodiesel apresenta vários parâmetros, como, óleos e graxas, DQO, DBO, cor, turbidez, pH, não conformes com a resolução 357/2005 CONAMA, que estabelece as condições para o lançamento de efluentes em corpos d'água, observando a necessidade de tratamentos desses efluentes (DRANKA; FAUSTO & RODRIGUES, 2008).

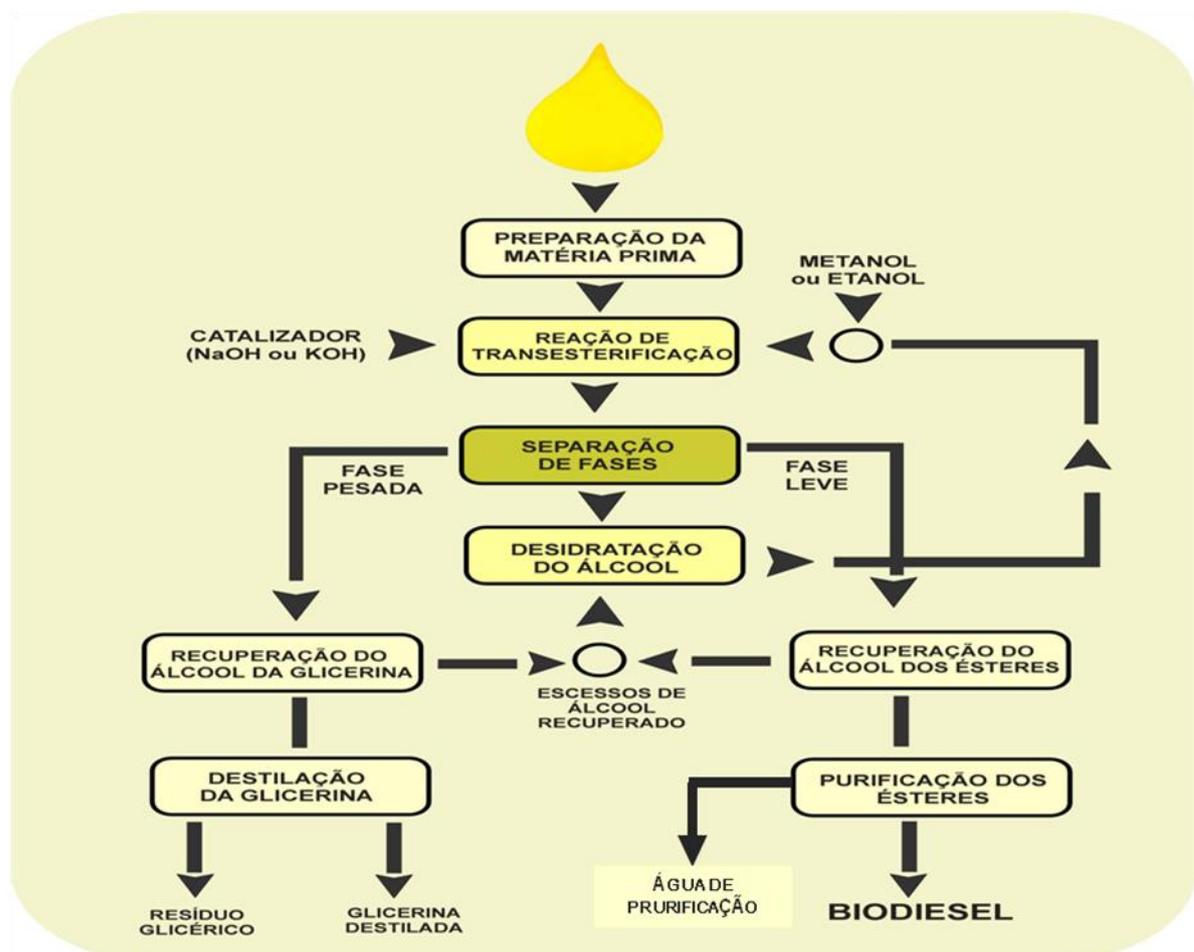


Figura 6 Fluxograma do processo de produção de biodiesel.

Fonte: PARENTE (2003).

3.3 Tratamento de efluente com alto teor de gordura

O aumento da atividade industrial no Brasil gerou um aumento na quantidade de efluentes gerados, os quais, na sua maioria, não são tratados ou não recebem o tratamento adequado, aumentando o seu impacto e tornando-se um preocupante problema ambiental. Para controlar essa situação, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu, pela Resolução 357, de 17 de março de 2005, as condições para o lançamento para efluentes em corpos hídricos, sendo para rios classe 2: pH entre 5,0 a 9,0; temperatura inferior a 40°C; concentração de óleo mineral até 20 mgL⁻¹ e para óleos vegetais e gorduras animais até 50 mgL⁻¹ (CONAMA, 2009).

Com essas condições da resolução CONAMA, as indústrias com efluentes com elevados teores de lipídios enfrentam um desafio, pois o óleo e outros derivados de petróleo possuem substâncias recalcitrantes para o meio ambiente, que podem causar vários danos ecológicos e também afetar a saúde dos seres humanos (COSTA *et al.*, 2007).

Segundo DRANKA, FAUSTO & RODRIGUES (2008), os teores de óleos e graxas (O&G) da água residuária de purificação de biodiesel é de 2678 ± 10 mgL⁻¹, observando assim a necessidade de tratamentos para esses efluentes.

Elevadas concentrações de lipídios resultam na formação de uma camada de gordura nas lagoas de tratamento, que impede as transferências de oxigênio, dos substratos e dos produtos, prejudicando o tratamento biológico aeróbio de degradação da matéria orgânica, podendo levar à morte dos micro-organismos (DURLI, 2007). No tratamento biológico anaeróbio de efluentes com excesso de óleos e graxas, a degradação de lipídeos é uma etapa limitante, pois os lipídeos possuem pouca biodegradabilidade, devido a sua baixa disponibilidade.

Nos reatores anaeróbios, em especial nos que operam com leitos de biomassa granular ou biomassa imobilizada como reatores UASB e filtros anaeróbios, problemas como colmatação do leito de lodo, formação de espuma, retenção de sólidos e variação de pH ocorrem com muita frequência no tratamento de efluentes com altos teores de gordura (VIDAL *et al.*, 2000).

Uma série de sistemas de pré-tratamento (caixas separadoras de gordura, separadores de placas paralelas, sistemas de flotação com ar dissolvido e tratamentos físico-químicos) são empregados para remover gorduras dos efluentes antes do tratamento principal, em geral de natureza biológica. As gorduras que não são retidas nestes sistemas de pré-tratamento entram nos sistemas de tratamento biológico e ocasionam problemas (ALESSI, 2005).

A aplicação de um pré-tratamento para hidrolisar e dissolver as gorduras pode melhorar a degradação biológica de efluentes com alto teor de óleos e graxas, acelerando o processo e reduzindo o tempo necessário para esse tratamento (ALESSI, 2005).

Para tentar solucionar esses problemas, processos alternativos vêm sendo utilizados, visando à redução da concentração de lipídeos contidos nos efluentes com elevada carga orgânica. O tratamento enzimático de efluentes é interessante, pois ajuda a melhorar a eficiência dos tratamentos convencionais (VALLADÃO; FREIRE & CAMMAROTA, 2007).

Uma das propostas é a utilização de hidrólise enzimática por lipases para remoção de óleos e graxas dos efluentes, seja pela utilização de micro-organismos produtores de lipases ou pela utilização de enzimas (isoladas ou não) (DURLI, 2007).

Dentre os fatores que afetam o processo enzimático de remoção de gorduras dos efluentes tem sido citada a especificidade da enzima em relação ao substrato, as características físico-químicas do efluente, o pH do meio de reação, a concentração e a composição de óleo (PEREIRA; CASTRO & FURIGO JUNIOR, 2003).

O uso de enzimas no tratamento de efluentes, apesar do seu custo, deve ser analisado, pois apresenta vantagens potenciais, como: simplicidade e facilidade no controle do processo; não há necessidade de aclimação de biomassa; não há efeitos de choque por carga de poluentes; podem ser aplicadas em processos com baixa ou alta concentração de poluentes e operam em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade. Entre as várias possibilidades, as enzimas podem ser usadas no tratamento de efluentes gerados nas indústrias petrolífera, têxtil, de papel e derivados de celulose e indústrias alimentícias em geral (Tabela 4) (MENDES *et al.*, 2005).

A avaliação do desempenho dos processos de tratamento para remoção de óleos e graxas é geralmente monitorada pela percentagem de ácidos graxos liberados na reação e pela redução na DQO do efluente, pois, alguns autores relatam uma correlação positiva entre DQO e percentagem de óleos e gorduras (AZBAR & YONAR, 2004). AQUINO, SILVA & CHERNICHARO (2006) citam que a DQO é um parâmetro global utilizado como indicador do conteúdo orgânico de águas residuárias.

Tabela 4 Enzimas com potenciais aplicações em tratamento de efluentes

Continua

Enzimas e fontes	Poluentes e efluentes
Azorredutase (<i>Pseudomonas luteola</i>)	Indústria de tintas
Celulase (<i>Trichoderma harzianum</i>)	Polpa de açúcar de beterraba
(<i>Trichoderma viride</i>)	Pré-tratamento termoquímico de celulignina
Cianidade (<i>Fusarium solani</i>)	Cianídeo
Cianidase hidratase (<i>Trichoderma spp.</i>)	Cianídeo
Monooxigenase e Iminodiacetato deidrogenase (gênero <i>Chelatobacter</i> e <i>Chelatococcus</i>)	Remoção de compostos derivados de ácidos aminopolicarboxílicos, por ex. EDTA, em efluentes municipais
Oxirredutases e NTA Deidrogenase (gênero <i>Chelatobacter</i> e <i>Chelatococcus</i>)	Remoção de compostos derivados de ácidos aminopolicarboxílicos, por ex. EDTA, em efluentes municipais
Polifosfatase e fosfotransferase	Remoção de fosfato biológico de efluentes

Nitrogenase (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	Remoção de excesso de lodo e proteínas em estação de tratamento de efluentes
Protease	Cianídeo
Protease pronase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Inativação de vírus bacteriófagos Cox A9 de efluentes, para reutilização da água
Enzimas Oxirredutase (<i>Pseudomonas syringae</i>)	Remoção de compostos fenólicos e catecol
Acetilcolinesterase e enzimas antioxidantes	Degradação de pesticidas de ambientes marinhos
Carbamil Hidrolase (<i>Arthrobacter</i> sp. RC100)	Degradação de inseticidas à base de N-metilcarbamato
Naftaleno-dioxigenase	Remoção de naftaleno
Catalase (<i>Bacillus</i> sp.)	Remoção de H ₂ O ₂ presente em efluentes de branqueamento de tecidos
β-Glicosidase e Manganês peroxidase (<i>PHanerochaete chrysosporium</i> e <i>Pleurotus sajorcaju</i>)	Remoção de corantes azo da indústria de alimentos e da indústria têxtil
Lipase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (Pancreática – PL250)	Redução do teor de lipídeos em efluentes de restaurantes
(<i>Penicillium</i> P4)	Redução do tamanho das partículas de lipídeos, de efluente de matadouro, em até 60%
(<i>Penicillium restrictum</i>)	Redução do teor de DQO de efluentes da indústria de óleo de oliva, em 60%
(<i>Yarrowia lipolytica</i>)	Remoção de DQO, em termos de lipídeos, em efluentes da indústria de derivados lácteos
(<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LP ₆₀₂ e <i>Anicetobacter calcoaceticus</i> LP ₆₀₉)	Redução de DQO, em até 80%, de efluentes da indústria de extração de óleo de oliva
(<i>Anicetobacter</i> sp.)	Redução do teor de lipídeos e DBO de efluente
(<i>Cândida rugosa</i>)	Redução do teor de lipídeos de efluentes de restaurantes
(pâncreas de porco)	Redução do teor de lipídeos e DQO de efluentes de abatedouros de frango
Lacase (<i>Coriolus versicolor</i> e <i>Funalia trogii</i>)	Redução do teor de lipídeos e de sólidos suspensos de efluentes da indústria de derivados lácteos
(<i>Chalara</i> (syn. <i>Thielaviopsis</i>) <i>paradoxa</i>)	Tratamento de efluente da indústria têxtil
(<i>Trametes versicolor</i>)	Remoção de compostos fenólicos da indústria de extração de óleo de oliva
(<i>lentinula edodes</i>)	Remoção de pesticidas à base de ureia, N',N'-(dimetil)-N-(2-hidroxifenil) ureia (2-HF)
Lacase e Manganês peroxidase (<i>Trametes versicolor</i>)	Remoção de compostos fenólicos, polifenólicos e <i>orto</i> -difenóis, da indústria de extração de óleo de oliva
(<i>Panus triginus</i>)	Remoção de hidrocarbonetos aromáticos
Lacase e Manganês peroxidase (<i>Geotrichum</i> sp. CCMI1019)	Remoção de compostos fenólicos da indústria de extração de óleo de oliva
(<i>PHanerochaete chrysosporium</i>)	Remoção de compostos azo, tintas, presentes em efluentes da indústria têxtil
Peroxidase	Remoção de compostos fenólicos e cor
Lignina peroxidase (<i>PHanerochaete chrysosporium</i>)	Tintas, clorofenóis, dibenzo[p]dioxinas, metoxifenóis, metilfenóis, 2-nitrofenol, fenol, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e licor de madeira pinus obtido por explosão à vapor
Manganês peroxidase (<i>PHanerochaete flavido-alba</i>)	Efluentes de indústria de extração de óleo de oliva, ricos em compostos fenólicos
Peroxidase de soja	Remoção de compostos fenólicos da indústria de extração de óleo de soja
Tirosinase (<i>Agaricus bisporus</i>)	Degradação de compostos fenólicos

Fonte: MENDES *et al.* (2005).

3.4 Lipase

As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono (FERNANDES, 2007).

Atualmente, as lipases dominam cerca de 5% do mercado mundial de enzimas. Entretanto, nota-se um crescimento desse mercado, devido ao vasto número de aplicações reveladas (PALMA *et al.*, 2000).

Lipases podem ser encontradas em células de tecidos animais e vegetais e podem ser produzidas por micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (PASTORE; COSTA & KOBLITZ, 2003).

As lipases têm sido utilizadas na modificação de óleos e gorduras, formulações de detergentes, manufaturas de alimentos, nos processos de síntese usados pela indústria de química fina e farmacêutica, manufatura de papel, produção de cosméticos, na indústria de combustível, como auxiliares no tratamento de efluentes gordurosos, dentre outras aplicações (LEAL, 2000).

A utilização de lipases, na prática, não tem sido maior devido aos custos de produção e às restrições de estabilidade necessárias para sua aplicação. A busca por processos de produção de lipases que possam diminuir os custos finais das enzimas é de grande interesse, pois pode viabilizar algumas aplicações pouco exploradas como, por exemplo, o tratamento de efluente gorduroso (LEAL, 2000).

A enzima lipase tem uma grande potencialidade para o tratamento de efluentes gordurosos tendo em vista sua grande especificidade e capacidade de hidrolisar os lipídeos presentes nesses efluentes. Como alternativa, buscando a viabilização econômica deste tipo de tratamento, o uso de micro-organismos produtores de lipase e alguns pontos de natureza técnica devem ser considerados, pois todos os detalhes operacionais do tratamento podem influenciar na qualidade dos efluentes. É necessário, também, fazer uso de preparações enzimáticas ativas e otimizar as condições adequadas de hidrólise (MENDES *et al.*, 2005).

Atualmente, a aplicação de lipases tem sido também sugerida na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais, gerados em frigoríficos e abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral (PASTORE; COSTA & KOBLITZ, 2003).

As lipases podem ser utilizadas diretamente na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas para promover um pré-tratamento do efluente, antes da digestão anaeróbia (MENDES *et al.*, 2005).

As lipases microbianas, de modo geral, apresentam atividade máxima em pH entre 6 e 8. A temperatura para a atividade máxima varia grandemente entre as lipases microbianas. As lipases bacterianas frequentemente apresentam atividade em temperaturas elevadas (entre 40 e 70°C). A termoestabilidade é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial como as lipases, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50 °C (FERNANDES, 2007).

SEMIONATO *et al.* (2007), objetivando degradação de gordura em sistemas de pré-tratamento de esgoto sanitário, isolaram bactérias lipolíticas existente no dispositivo de remoção de materiais gordurosos da estação de tratamento de esgoto (ETE) da Universidade Federal do Espírito Santo, caracterizando e avaliando seu potencial lipolítico, visando à sua utilização em sistemas de pré-tratamento de esgotos domésticos, afim de reduzir a carga orgânica e a quantidade de óleos e graxas, facilitando a tratabilidade dos efluentes e diminuindo seus impactos negativos. O estudo resultou no isolamento de 11 cepas de bactérias lipolíticas, sendo duas com considerável potencial de degradação de óleos e graxas de espuma de esgoto doméstico ($0,38 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,34 \text{ U.mL}^{-1}$). Essas cepas possuem atividade lipolítica de valor aproximado ao de bactérias utilizadas para degradar óleo de soja como: *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas sobria* LP004, de $0,38$ e $0,31 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente.

ANDRETTA, DAMSCHI JR. & ONOFRE (2007), com o objetivo de isolar micro-organismos potencialmente produtores de lipases, capazes de serem utilizados em sistemas de tratamentos de efluentes, concluíram que efluentes produzidos em laticínios possuem alta carga microbiana e, desta população, isolaram seis espécies de fungos produtores de lipases. Os que obtiveram maiores índices enzimáticos foram os fungos *Aspergillus flavus* (2,02) e *Aspergillus terreus* (2,10).

VIEIRA *et al.* (2006), com o intuito de determinar a capacidade degradadora de biodiesel por bactérias, previamente isoladas de tanques de armazenamento de diesel, com capacidade degradadora de diesel, concluíram que o teste de atividade enzimática utilizando Tween 20 e Tween 80 demonstrou ser efetivo para a seleção de bactérias com capacidade de utilização de biodiesel. Nos testes de degradação de biodiesel, as bactérias selecionadas foram capazes de utilizar este produto, sendo que, dos 25 isolados bacterianos, 16 (64%) apresentaram pelo menos uma atividade enzimática.

VALLADÃO, FREIRE & CAMMAROTA (2007) trabalharam com lipases produzidas por *P. restrictum* por fermentação no estado sólido (FES), utilizando como substrato torta de babaçu, para tratamento de efluentes de matadouro aviário. O teor de O&G, obtido por meio de adição de gordura ao efluente, variou de 150 a 1200 mg.L^{-1} . As amostras foram pré-tratadas com 0,1 e 0,5 ou 1% (m/V) do material fermentado, sendo incubadas por 22 h, a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 120 rpm. O teste de biodegradabilidade foi anaeróbio, conduzido em frascos de 100 mL, com 90 mL de efluente bruto ou pré-hidrolisado, misturado com o lodo anaeróbio. Na etapa de hidrólise, observou-se a diminuição na quantidade de ácidos liberados com o aumento na concentração de O&G para as três concentrações mais baixas (150-750 mg.L^{-1} de O&G). Entretanto, observaram-se aumentos de ácidos livres, com o aumento da concentração do material fermentado em todas as concentrações de O&G. Nos testes de biodegradabilidade anaeróbio, efluentes com concentração de O&G de 1200 mg.L^{-1} ,

pré-tratados com 0,1% (m/V) de material fermentado, apresentaram grande eficiência na remoção de DQO (85%), em relação ao efluente bruto (53%). Já os efluentes pré-tratados com a concentração de material fermentado de 0,5 e 1% (m/V) não resultaram em uma grande remoção de DQO.

DURLI (2007), com o objetivo de reduzir o teor de gordura contida no efluente, empregou lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11, produzidas por FES, no tratamento de efluentes de indústria de laticínio. A eficácia da hidrólise da gordura foi avaliada com base no teor de ácidos livres no efluente e pela remoção de óleos e graxas (O&G). Nos experimentos iniciais (0,1%, m/V de sólido fermentado, pH 7,0, 30°C e 150 rpm) houve remoção de 82% de O&G depois de 24 h. O tratamento enzimático (com amostras autoclavadas, 348 mg.L⁻¹ O&G) foi estudado utilizando-se três variáveis (temperatura, pH e atividade enzimática adicionada no efluente) e três níveis (T = 25, 30 e 35 °C; pH = 5,0, 7,0 e 9,0; e atividade enzimática = 23,6, 47,2 e 70,8 U.L⁻¹). Os experimentos foram interrompidos depois de 48 h, avaliando-se a remoção de O&G, a DQO e a atividade enzimática residual no efluente (U.L⁻¹). A máxima remoção de O&G prevista pelo modelo foi de 60%, após 48 h, nas condições de 29 a 32 °C, pH 8,0 a 9,2 e atividade enzimática adicionada no efluente de 47,2 U.L⁻¹. Diferentes amostras de efluente foram tratadas dentro das condições otimizadas e apresentaram 60% de remoção de O&G, mas somente depois de 72 h de incubação.

MENDES, PEREIRA & CASTRO (2006), avaliando o efeito do pré-tratamento de efluentes de laticínios por lipase pancreática na remoção de matéria orgânica por biodegradação anaeróbia, verificaram que, em 24 h de hidrólise, a maior formação de ácidos graxos (54,36 mM) foi obtida em meio reacional contendo efluente bruto, suplementado com 10 mM de íons cálcio a pH 8,0, ajustado com NaOH 1M e incubado com 0,5% m/v de enzima. No efluente hidrolisado, submetido à biodigestão anaeróbia, houve redução de cor e da demanda química de oxigênio de 80,9 e 77,5%, enquanto no efluente bruto as reduções equivalentes foram iguais a 45,0 e 13,9%.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi realizada nos laboratórios de Saneamento Ambiental e Microbiologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *campus* Cascavel.

4.1 Coleta e Armazenagem da Água Residuária

A água residuária utilizada no presente trabalho é oriunda de uma indústria produtora de biodiesel, localizada no norte do Paraná. Esta indústria produz cerca de 120 m³ de biodiesel por dia, produzido por transesterificação entre óleo de soja e metanol, usando como catalisador o metilato de sódio.

A água de purificação do biodiesel foi coletada no final da caixa de retenção de gordura (Figura 7), em galões plásticos de cinco litros e em frascos de vidro (para isolamento microbiano). Os galões foram armazenados em geladeira (6 °C) até o momento de uso.



Figura 7 Tanque de retenção de gordura.

4.2 Caracterização da Água Residuária

Foram feitas análises das características físico-químicas iniciais da água residuária da lavagem do biodiesel, quanto aos parâmetros de demanda química de oxigênio (DQO), O&G, sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), turbidez, cor, pH, ácidos livres e nitrogênio total Kjeldahl (NTK), seguindo as metodologias descritas pela Tabela 5.

Tabela 5 Parâmetros que foram realizados para caracterização do resíduo

PARÂMETRO	UNIDADES	MÉTODO	PROTOCOLO APHA (1995)	Outra metodologia
DQO	mgO ₂ L ⁻¹	Colorimétrico	5220-D	
ST	mgL ⁻¹	Gravimétrico	2540-B	
SV	mgL ⁻¹	Gravimétrico	2540-E	
O&G	mgL ⁻¹	Gravimétrico por Centrifugação	-	SUEHARA <i>et al.</i> (2005)
TURBIDEZ	UNT	Nefelométrico	2130-B	
COR	UC	Espectrofotométrico	2120-C	
pH	-	Potenciométrico	4500-H ⁺ - B	
NTK	mgNL ⁻¹	Semi-micro-Kjeldahl	4500-N _{org} -B	
Ácidos livres	%	Titulométrico	-	ROSA (2004)

4.3 Isolamento dos Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram isolados em placas de Petri, previamente preparadas e esterilizadas, contendo meio de cultura seletivo, conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 Composição do meio de cultura de isolamento dos micro-organismos

Reagente	Massa (g.L ⁻¹)
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	1
Extrato de levedura	1
Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	0,2
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ 7H ₂ O)	0,2
Óleo de soja	1
Ágar	18

Pela técnica de *streak-plate* (Figura 8), a água residuária foi inoculada nas placas, as quais foram incubadas por 24 h a 30 °C, para o crescimento dos micro-organismos (SUEHARA *et al.*, 2005).

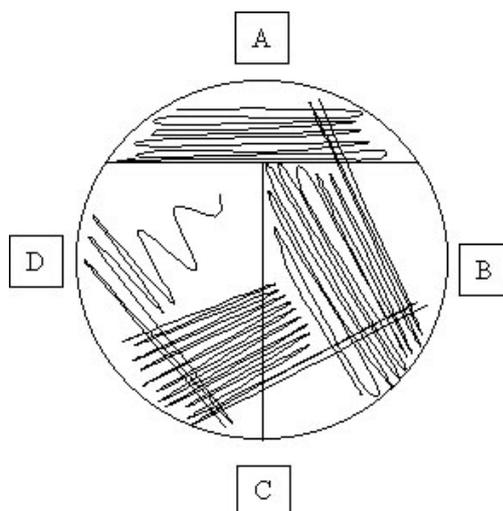


Figura 8 Estrias realizadas em placa de Petri pelo método *streak-plate*.

Em seguida, as colônias formadas foram inoculadas novamente em placas de Petri, com o mesmo meio de cultura, pela mesma técnica e incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas. Este procedimento foi repetido até que cada colônia se apresentasse totalmente isolada em cada placa.

Por fim, cada bactéria isolada foi inoculada em tubos de ensaio, contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 h a 30 °C, para posterior seleção dos micro-organismos que foram usados no experimento (VIEIRA *et al.*, 2006).

4.4 Seleção dos Micro-organismos

Cada micro-organismo isolado foi testado quanto ao potencial de biodegradação do resíduo em estudo, pela determinação da atividade enzimática (lipase). As duas cepas que apresentaram menores índices enzimáticos foram selecionadas para a etapa seguinte. Para isso, alíquotas de 100 µL do caldo BHI foram retiradas e inoculadas em placas de Petri contendo os meios específicos. As placas foram incubadas a 30 °C por 96 h (VIEIRA *et al.*, 2006) e o Índice Enzimático (IE) foi determinado, após este tempo, de acordo com as metodologias específicas para cada enzima.

O IE expressa a relação entre o diâmetro do halo de degradação do substrato e o diâmetro de crescimento da colônia de micro-organismos (HANKIN; ZUCKER & SANDS, 1971; HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

4.4.1 Determinação da atividade lipolítica

Para a determinação da atividade lipolítica, foi utilizado o meio de cultura contendo (g.L^{-1}): peptona 10,0, NaCl 5,0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1, ágar 18,0, pH 7.4. Após a esterilização do meio de cultura, foi adicionado Tween 20 (previamente esterilizado) numa concentração final de 1% (v/v). O meio foi vertido sob placas de Petri esterilizadas e, após solidificação, as bactérias previamente crescidas foram inoculadas e foi observada a presença de halos claros de degradação (VIEIRA *et al.*, 2006).

4.5 Preparo para Ensaio de Degradação de Lipídios

4.5.1 Preparo do inóculo

Após o isolamento e seleção, os micro-organismos com melhor potencial foram conservados em tubos inclinados com meio de cultura, conforme descrito no item 4.3, e armazenados em refrigerador até o momento do seu uso.

O preparo do inóculo foi dividido em três fases, realizado identicamente para as duas cepas:

1. Ativação das células: 50 mL de meio de cultura (1g.L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $1,0\text{g.L}^{-1}$ de extrato de levedura; $0,2\text{ g.L}^{-1}$ KH_2PO_4 ; $0,2\text{ g.L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g de óleo de soja;) foram esterilizados em erlenmeyer de 250 mL e, depois de frio, foram inoculados com alça de platina da cultura pura e incubados em agitador-incubador a 180 rpm e 35 °C por 24 h.
2. Pré-inóculo: a suspensão de células obtida foi inoculada em outro erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do resíduo (água de lavagem do biodiesel) esterilizado, com adição de uma fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). A inoculação foi realizada na proporção de 10% (v/v) e incubada nas mesmas condições da anterior.
3. Obtenção do inóculo: a suspensão de células obtida foi inoculada, na proporção de 10% (v/v), em outro erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do resíduo + nitrogênio esterilizado, incubado em agitador por mais 24 h.

A padronização do inóculo foi feita por densidade óptica (FIORETTO, 1987), ajustando-se a absorbância do inóculo em espectrofotômetro a 580 nm de comprimento de onda, pela adição de suspensão celular, a uma diluição 10^{-1} , até alcançar a absorbância de 0,2. Essa absorbância correspondeu a $3,6 \times 10^8$ células. mL^{-1} para os dois

micro-organismos, medida pela contagem em diluição em placa, após a construção de uma curva de diluição.

4.5.2 Preparo do substrato

O substrato utilizado foi a água de lavagem do biodiesel, coletada e caracterizada conforme anteriormente descrito. Neste resíduo (50 mL de amostra), para o desenvolvimento dos cultivos foi adicionada uma fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄) e corrigido o pH, de acordo com cada tratamento avaliado. Os efeitos da biodegradação do resíduo foram avaliados no sobrenadante do substrato após o cultivo. Para tanto, após os cultivos (35 °C e 180 rpm) o substrato era centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos, o precipitado era descartado e o sobrenadante era analisado quanto os parâmetros: DQO, ácidos livres, pH, atividade lipásica e O&G.

4.5.2.1 Determinação do teor de ácidos livres

A eficiência da hidrólise enzimática do efluente foi avaliada pela determinação do teor de ácidos totais liberados. Alíquotas de 5 mL do efluente submetido à ação enzimática foram paralisadas da atividade enzimática pela adição de uma mistura acetona:etanol (1:1v/v) (ROSA, 2004). As alíquotas foram tituladas com solução NaOH 0,01 molL⁻¹ com fenolftaleína como indicador. O teor final de ácidos livres foi obtido pela equação abaixo:

$$AL = \frac{V_{(NaOH)} * M_{(NaOH)} * 1000}{V_a} \quad (1)$$

em que:

- AL = teor de ácidos livres (mmoles mL⁻¹);
- V_(NaOH) = volume de solução de NaOH usado na titulação (mL);
- M_(NaOH) = concentração da solução de NaOH (molL⁻¹);
- V_a = volume da amostra (mL).

4.5.2.2 Determinação da atividade lipásica

A determinação da atividade lipásica pelo método titulométrico foi realizada segundo DELLAMORA-ORTIZ *et al.* (1997), que utilizaram 5 mL de emulsão de óleo de oliva

20% (v/v) em goma arábica 5% (p/v) e 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. O ensaio foi realizado em *shaker* com agitação de 240 rpm, a 37 °C, sendo iniciado pela adição de 3 mL da preparação enzimática, previamente aquecida à temperatura de ensaio. Após 15 minutos de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura etanol e acetona (1:1). Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados pela titulação com NaOH 0,025 N, utilizando fenolftaleína como indicador. Também foi utilizado um branco, contendo 3 mL de água destilada em vez do preparo enzimático. A atividade lipásica foi calculada de acordo com a Equação 2 e expressa em micromoles de ácidos graxos liberados, por minuto de reação, por mililitro de amostra.

$$A (U.mL^{-1}) = \frac{(V_1 - V_2) * N * 100}{V_3 * T} \quad (2)$$

em que:

- A = atividade enzimática;
- V₁ = volume de NaOH gasta na titulação da amostra;
- V₂ = volume de NaOH gasta na titulação do branco;
- N = normalidade corrigida do NaOH utilizado;
- V₃ = volume utilizado do preparo enzimático;
- T = tempo de reação (minutos).

4.5.2.3 Determinação do teor óleos e graxas

A concentração de óleo do substrato foi determinada pelo método de extração por hexano, de acordo com SUEHARA *et al.* (2005). Amostras de 15 mL foram acidificadas com 180 µL de HCl 2N, em seguida foram agitadas com a adição de 1,5 mL de *n*-hexano. Após este processo, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm, por 5 minutos e a camada de hexano formada foi coletada em um béquer, previamente seco e pesado. Esta extração foi repetida por 3 vezes. O hexano coletado foi seco em estufa a 80 °C por 24 h. A concentração de óleo foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$O\&G (g.L^{-1}) = \frac{(P_2 - P_1) * 1000}{V_a} \quad (3)$$

em que:

- P₁ = peso inicial do béquer, em gramas;

P_2 = peso, em gramas, do béquer com hexano coletado e seco;

V_a = volume utilizado da amostra, em mililitros (15 mL).

4.6 Ensaio Inicial de Degradação de Lipídios

Com o intuito de definir qual o micro-organismo, selecionado anteriormente, tinha maior eficiência na remoção de gordura do efluente em estudo e encontrar seus respectivos tempos de máxima degradação, foi feito um ensaio utilizando as condições descritas no item 4.5 e, baseando-se na literatura, fixaram-se as variáveis pH (5,95), temperatura (35 °C), rotação (180 rpm) e concentração de nitrogênio (3 g.L⁻¹), tendo como variáveis os micro-organismos pré-selecionados (A e B) e o tempo (24, 48, 72, 96 e 120 h), com três repetições para cada amostra.

4.7 Identificação dos Micro-organismos

Os micro-organismos pré-selecionados, utilizados no ensaio inicial de degradação de lipídios, foram identificados quanto à sua morfologia e coloração de Gram. Após definir o micro-organismo com maior eficiência de remoção de gordura, enviou-se o mesmo para o Instituto André Tosello em Campinas, SP, para identificar gênero e espécie, por meio dos métodos bioquímicos.

4.8 Otimização do Processo de Remoção de Gordura

Objetivando otimizar o processo de remoção de gordura no tratamento da água residuária da purificação do biodiesel, com o tempo e micro-organismo definidos, optou-se por verificar a influência dos fatores (variáveis independentes) pH e concentração de nitrogênio, uma vez que são variáveis que interferem diretamente no desempenho microbiano (GONÇALVES, 2007). Para isso, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), tipo estrela ($\alpha = 45^\circ$), que compreende um fatorial (2^2) com os níveis (-1 e +1), os pontos axiais (-1,414 e +1,414) e três repetições no ponto central (0), resultando em 11 ensaios. O ponto central fornece uma média para estimar o erro experimental e a falta de ajuste. Os pontos axiais foram adicionados para estimar a

curvatura do modelo (BARROS NETO; SCARMINO & BRUNS, 2007). O DCCR e os níveis das variáveis, cujos valores foram ampliados em função dos dados literários e dos resultados obtidos com o planejamento inicial, são apresentados na Tabela 7. As demais variáveis foram previamente fixadas em: temperatura 35 °C, rotação 180 rpm e tempo 48 h.

Tabela 7 Valores codificados e reais do delineamento experimental (DCCR)

Variáveis independentes	Níveis				
	(- α)	(-1)	(0)	(+1)	(+ α)
pH	4,2	4,68	5,85	7,02	7,5
Concentração de Nitrogênio (g.L ⁻¹)	0,71	1,74	2,49	3,24	3,56

Notas: $\alpha = (2^N)^{1/4} = 1,414$; N = número de variáveis independentes.

Como não foi possível encontrar o ponto de máxima remoção de gordura, baseado no resultado anterior e a partir dos coeficientes do modelo, projetou-se o caminho de máxima inclinação (BARROS NETO; SCARMINO & BRUNS, 2007) e, fundamentado neste caminho, calculou-se o novo DCCR. Os níveis das variáveis são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 Valores codificados e reais na 2^o rodada do DCCR

Variáveis independentes	Níveis				
	(- α)	(-1)	(0)	(+1)	(+ α)
pH	6,1	6,5	7,5	8,5	8,9
Concentração de Nitrogênio (g.L ⁻¹)	2,00	2,58	4,00	5,42	6,00

Notas: $\alpha = (2^N)^{1/4} = 1,414$; N = número de variáveis independentes.

4.9 Ensaio Final de Degradação de Lipídios

Afim de validação experimental dos modelos propostos para remoção de gordura foi realizado, em triplicata, um ensaio nas condições ótimas estabelecidas de pH e concentração de nitrogênio.

Os resultados foram comparados com um ensaio realizado nas mesmas condições do experimento de validação, mas utilizando como inóculo o produto comercial Hábil FTW SF, utilizado pela indústria para o tratamento da água residuária, o qual traz em sua composição enzimas, composto biológico selecionado, macro e micronutrientes, em uma concentração estabelecida como ideal pelo fabricante de 50 g.L⁻¹.

4.10 Análise estatística dos dados

O *software* STATISTICA, versão 7.0 (StatsoftTM, USA), foi utilizado na análise estatística dos dados em todas as etapas, determinando-se os efeitos das variáveis independentes, o cálculo dos coeficientes de regressão, a análise de variância (ANOVA), e o teste de comparação de médias Tukey, para a obtenção dos gráficos de superfícies de resposta e de contorno, ao nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do Resíduo

Os valores obtidos na caracterização do resíduo são descritos na Tabela 9. Apenas o pH apresenta valor dentro dos parâmetros estabelecidos pela resolução CONAMA 357/05, para lançamento de efluente. Os demais parâmetros apresentam valores elevados, necessitando de tratamentos para seu posterior lançamento em corpos hídricos.

Tabela 9 Caracterização inicial da água de purificação do biodiesel

Parâmetros	Unidades	Valor Médio	Desvio Padrão	Coef. Variação (%)
DQO	gO ₂ L ⁻¹	81.748,38	2262,3	2,77
ST	gL ⁻¹	23,89	3,01	12,60
SV	gL ⁻¹	18,48	2,65	14,34
O&G	gL ⁻¹	6,76	0,32	4,73
TURBIDEZ	UNT	290	-	-
COR	UC	5.450	-	-
pH	-	6,2	0,10	1,61
NTK	mgNL ⁻¹	0	0,00	0,00
Ácidos livres	%	17,21	0,25	1,45

Segundo DRANKA, FAUSTO & RODRIGUES (2008), o pH encontrado em seu estudo da água residuária de purificação de biodiesel foi de 6,3, semelhante ao apresentados por este estudo: 6,2. Quanto ao teores de óleos e graxas (O&G), obtiveram um valor de 2678 ± 10 mg/L, inferior ao encontrado no resíduo desta pesquisa, evidenciando assim a necessidade de tratamento com a adoção de um maior rigor nos padrões de descarte de águas residuárias.

Comparando os resultados obtidos com as condições de lançamento para efluentes em corpos hídricos, estabelecidas pelo CONAMA, na Resolução 357/05, verifica-se a necessidade do enquadramento do teor de gordura, sendo os limites para rio classe 2: pH entre 5,0 e 9,0; temperatura inferior a 40°C; concentração de óleo mineral até 20 mg/L e para óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L (CONAMA, 2009).

Em relação à demanda química de oxigênio (DQO), este resíduo apresentou uma concentração muito elevada, se comparado com outros efluentes como os de laticínios, em que a DQO varia entre 40.000 e 48.000 mg.L⁻¹ (MENDES *et al.*, 2005). O teor de nitrogênio presente na água de lavagem do biodiesel foi nulo, o que demonstra a necessidade de adição deste nutriente em possíveis tratamentos biológicos.

5.2 Seleção dos Micro-organismos

Baseados nos diâmetros dos halos e das colônias encontrados no teste da atividade de produção de lipase, calcularam-se os índices enzimáticos (Tabela 10). Quanto menor o IE maior o potencial apresentado pelo micro-organismo na produção enzimática. Se o IE for igual a 1,0 significa que a produção da enzima é nula, se estiver entre 1 e 0,64 a produção é positiva e se for menor que 0,64 indica que o micro-organismo apresenta uma produção fortemente positiva (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Tabela 10 Média do índice enzimático (IE) encontrado para cada micro-organismo, baseado na relação entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia+halo

Micro-organismo	Diâmetro da Colônia (cm)	Diâmetro da Colônia+Halo (cm)	IE
A	2,67	4,37	0,56
B	2,20	3,77	0,57
C	3,17	4,53	0,69
D	3,90	5,00	0,74
E	3,07	4,13	0,74
F	1,33	1,33	1,00

Pode-se verificar que a cepa isolada “F” apresentou ausência na produção da enzima lipase e a cepa “A” possui a maior atividade enzimática, estando a maioria das cepas com uma produção positiva (Figura 9).

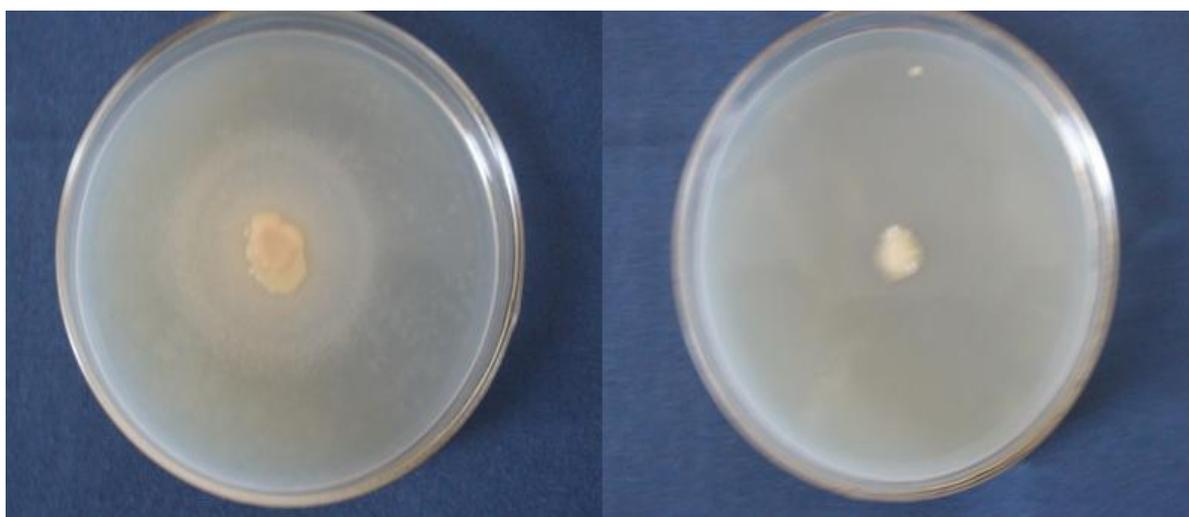


Figura 9 Fotos ilustrativas das cepas isoladas, à esquerda (micro-organismo B) com e à direita (micro-organismo F) sem halo de degradação.

De acordo com a análise estatística realizada, pode-se comprovar a significância da variável micro-organismo na produção da enzima. Os micro-organismos identificados com A

e B apresentaram-se estatisticamente semelhantes, a 5% de significância, e com o menor IE, ou seja, com o maior potencial de degradação de gordura (Figura 10).

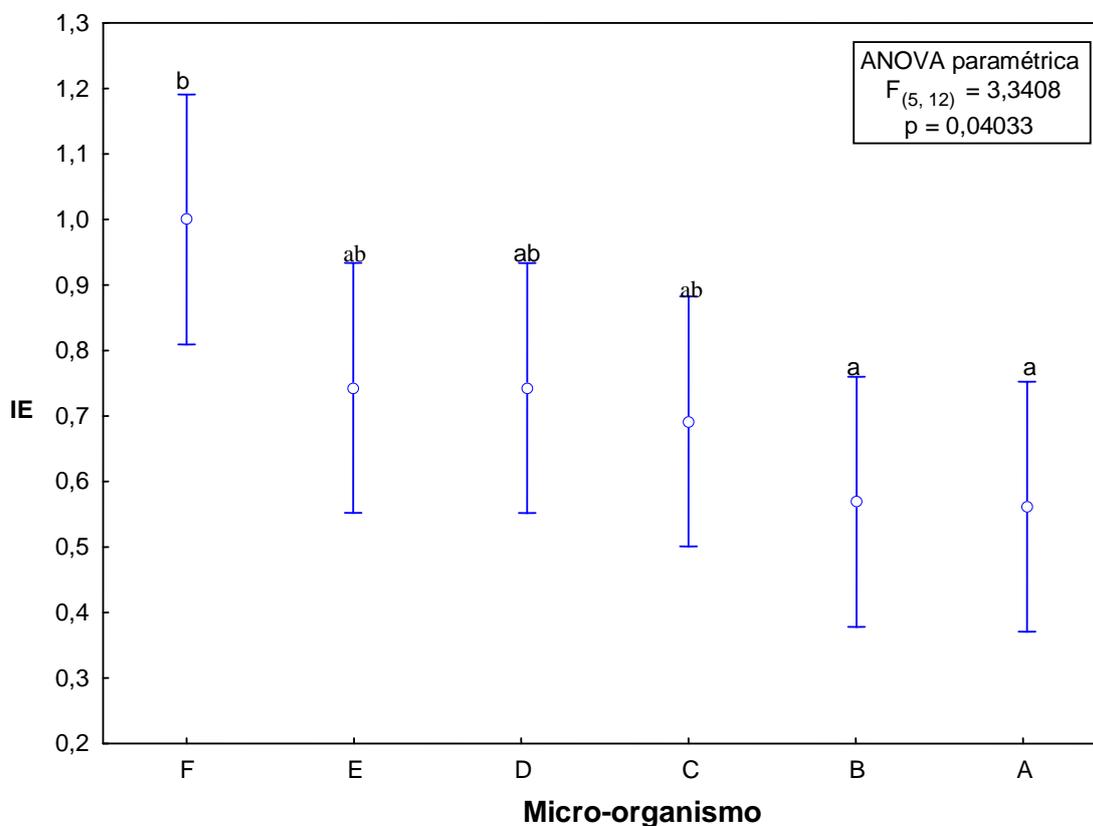


Figura 10 Média \pm 95% IC para valores de índice enzimático obtidos pelos diferentes micro-organismos.

Nota: *Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey a posteriori.

LOPERENA *et al.* (2009), ao isolarem micro-organismos nativos do tratamento aeróbio da água residuária de laticínios, obtiveram 41 culturas e, destas, 19 produziram lipase, 12 protease e 2 culturas produziram ambas as enzimas, sendo que 21 apresentavam alto potencial de atividade lipolítica e/ou atividade proteolítica.

DARTORA *et al.* (2003), visando selecionar micro-organismos produtores de enzimas extracelulares do tipo lipases, isolaram micro-organismos utilizando meio de cultura líquido a base de soro de queijo, nas condições de 30 °C por 48 h. Como resultado, das 12 cepas isoladas (sete linhagens de leveduras, dois fungos filamentosos e três bactérias), evidenciaram atividade lipolítica, através do índice enzimático (IE); em três linhagens de leveduras, duas cepas de bactéria e dois fungos filamentosos são produtores de lipases.

VIEIRA *et al.* (2006), estudando a capacidade de degradação do biodiesel de óleo de palma por bactérias, previamente isoladas de tanques de armazenamento de diesel, com capacidade degradadora de diesel, verificaram que, dos 25 isolados bacterianos 16 (64%) apresentaram pelo menos uma atividade enzimática (lipolítica e/ou esterásica). Estes

autores concluíram que o teste de atividade enzimática, utilizando Tween 20 e Tween 80, demonstrou ser efetivo para a seleção de bactérias com capacidade de utilização de biodiesel, pois, nos testes de degradação de biodiesel, as bactérias selecionadas foram capazes de utilização deste produto.

5.3 Ensaio Inicial de Degradação de Lipídios

Na Tabela 11 é apresentado o teste de ANOVA, tendo como variável resposta o teor de óleos e graxas (O&G) e variáveis preditoras, o tipo de inóculo utilizado e o tempo de incubação. Neste teste, verifica-se que apenas a variável tempo apresentou-se estatisticamente significativa, a 5% de probabilidade.

Tabela 11 Análise de variância (ANOVA) para o teor de O&G

	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Soma das Médias	F	p
Tempo	101,67	5	20,33	14,97	0,000
Inóculo	4,68	1	4,68	3,44	0,076
Tempo*inóculo	11,50	5	2,30	1,69	0,175
Erro	32,59	24	1,36		

Na Figura 11 é representada a curva de redução do teor de O&G, ao longo das 120 h de incubação para os dois micro-organismos selecionados. Baseando-se nestes dados, nota-se que, apesar de não diferirem estatisticamente, o micro-organismo A apresentou uma remoção de gordura superior ao micro-organismo B, sendo este o selecionado para a próxima etapa de otimização do processo de remoção de O&G.

Para a variável tempo, apesar de que a partir de 24 h de incubação não apresentou variação no teste de Tukey (0,05), foi adotado o tempo de 48 h para os testes posteriores.

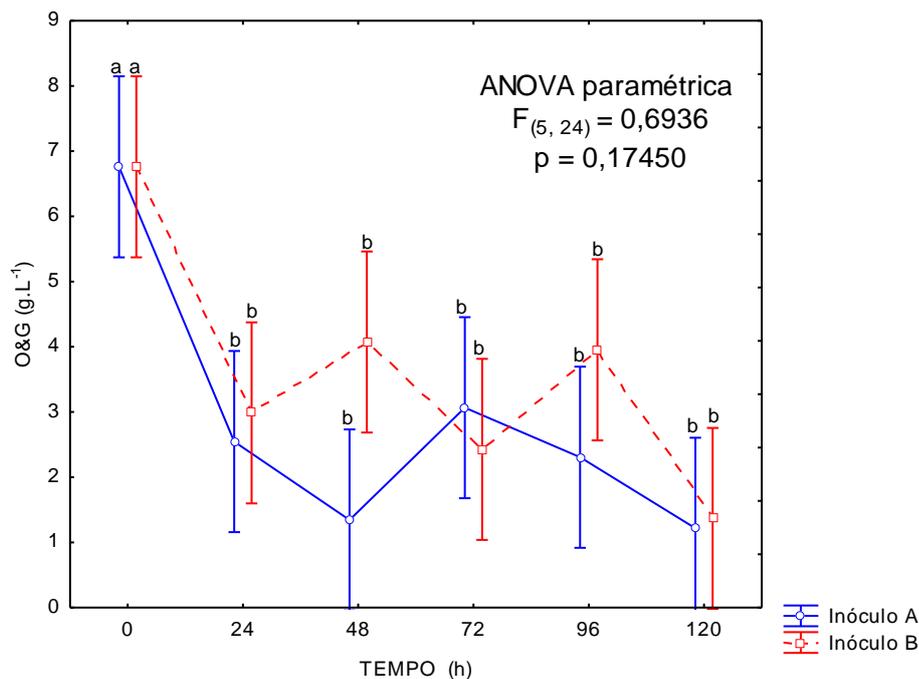


Figura 11 Cinética da redução do teor de O&G.

Nota: *Letras distintas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey a posteriori.

Na Tabela 12 são apresentados os valores de pH, remoção de O&G, remoção de DQO, acidez e atividade lipásica, para todos os tratamentos avaliados. O inóculo A, no tempo de 48 h, apresentou uma atividade lipásica de $0,28 \text{ U.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e 37,31% de remoção de DQO e 80,11% de remoção de O&G.

Nessa tabela, pode-se observar uma relação inversa entre o pH e a acidez das amostras avaliadas. Para ambos os inóculos (A e B), quanto maior foi o tempo de reação menor o pH do efluente incubado e maior a acidez livre analisada. As remoções de O&G e de DQO apresentaram uma tendência de aumento ao longo do período de incubação.

Os dois inóculos, ao término das 120 h, obtiveram um percentual de acidez e remoção de DQO praticamente iguais. Os valores para o inóculo A foram 23,54 e 40,59% e para o inóculo B 23,61 e 40,96%, respectivamente. Entretanto, a remoção de gordura e a atividade lipásica foram superiores para os tratamentos utilizando o micro-organismo A: 87,33% e $0,30 \text{ U.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$, respectivamente.

Pela estatística descritiva, pode-se verificar que para as variáveis respostas pH, acidez e atividade lipásica os tratamentos apresentaram um coeficiente de variação baixo, o que indica dados homogêneos, refletindo resultados bastante similares (GOMES, 2000). Alguns tratamentos, nas variáveis de remoção de O&G e remoção de DQO, apresentaram coeficiente de variação acima do recomendado, que é de 10%, indicando que estes apresentaram dados heterogêneos.

RAJENDRAN & THANGAVELU (2009) avaliaram a produção de lipase por *Rhizopus arrhizus*, em uma mistura de componentes, e encontraram um valor máximo de produção de lipase igual $3,98 \text{ U mL}^{-1}$. BROZZOLI *et al.* (2009) produziram lipase utilizando água residuária da indústria produtora de óleo de oliva como meio de cultura para a *Candida cylindracea* e obtiveram valores que chegaram até $20,4 \text{ U mL}^{-1}$. Valores bastante superiores à produção de lipase obtida neste experimento, possivelmente, devido às características do resíduo que não favoreceram o desenvolvimento microbiano.

LOPERENA *et al.* (2009) avaliaram a aplicação de diferentes micro-organismos, no tratamento de resíduos provenientes de uma indústria de laticínios, e obtiveram médias de remoção entre 34 e 44%, em um tempo de 48 h, com a aplicação do micro-organismo *Bacillus* sp. Estes valores são semelhantes aos obtidos pelos inóculos A e B desta pesquisa, no mesmo tempo de remoção.

Tabela 12 Média dos parâmetros avaliados para os micro-organismos A e B no tempo de 24 a 120 h

Inóculo	Tempo (horas)	pH			Rem. O&G (%)			Rem. DQO (%)			Acidez (A%)			At. Lipasica U/mL.min		
		Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
A	24	4,46	0,23	5,22	62,33	4,87	7,81	36,78	7,72	20,99	20,85	0,21	1,00	0,25	0,01	5,21
	48	4,05	0,02	0,38	80,11	13,25	16,54	37,31	8,41	22,53	20,82	0,19	0,90	0,28	0,01	4,81
	72	3,95	0,01	0,15	54,64	3,30	6,05	38,45	3,30	11,03	22,80	1,13	4,97	0,31	0,01	3,33
	96	3,67	0,15	4,01	65,88	16,06	24,38	38,87	2,19	5,64	24,81	0,84	3,37	0,29	0,03	10,71
	120	3,60	0,11	3,14	87,33	4,95	5,67	40,59	1,11	2,73	23,54	0,45	1,89	0,30	0,03	10,06
B	24	3,93	0,03	0,67	43,10	0,42	0,97	29,37	9,70	33,02	18,03	0,58	3,21	0,27	0,01	5,38
	48	4,03	0,03	0,62	39,74	0,21	0,53	36,37	9,41	25,87	18,78	0,36	1,94	0,27	0,02	7,96
	72	3,92	0,06	1,44	65,58	5,44	8,29	28,07	5,53	19,71	17,91	1,53	8,53	0,27	0,01	5,34
	96	3,74	0,02	0,57	34,07	0,77	2,25	40,59	1,99	4,91	21,38	0,32	1,49	0,28	0,00	1,30
	120	3,52	0,05	1,43	79,78	10,11	12,67	40,96	4,54	11,08	23,61	0,21	0,88	0,29	0,00	0,00

Notas: DP: Desvio Padrão;

CV: Coeficiente de Variação.

5.4 Identificação do Micro-organismo

Com a análise morfológica, observou-se que as duas cepas microbianas com alto potencial de produção de lipase, denominadas como A e B, são bactérias que apresentam forma de bacilos com coloração Gram negativa (Figura 12).

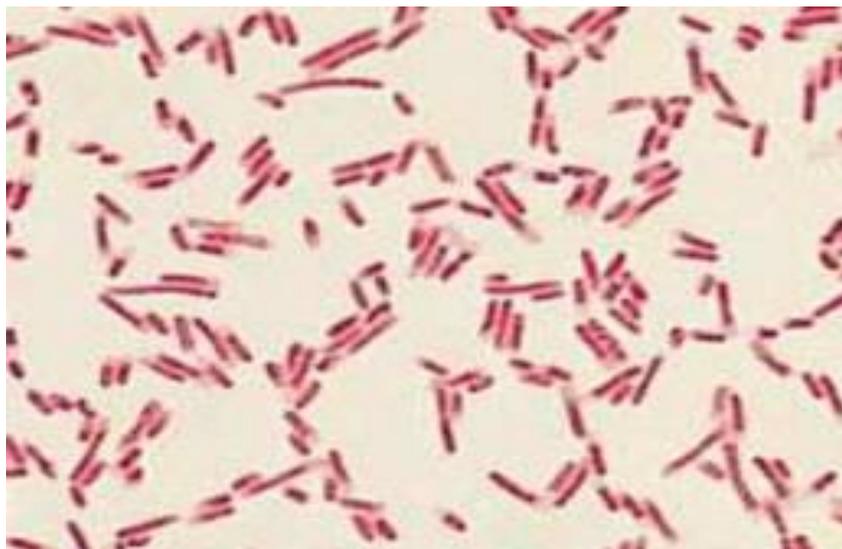


Figura 12 Imagem ilustrativa de bacilos Gram negativos.

A cepa denominada como A, a qual apresentou os melhores resultados de remoção de gordura da água residuária de lavagem do biodiesel, nas condições estudadas, foi identificada como *Klebsiella oxytoca* (Flugge 1886) Lautrop 1956 (Figura 13). Este é um micro-organismo que se encontra no trato intestinal dos seres humanos e de animais e pode ser isolada de vários processos patológicos e do ambiente aquático e botânico.

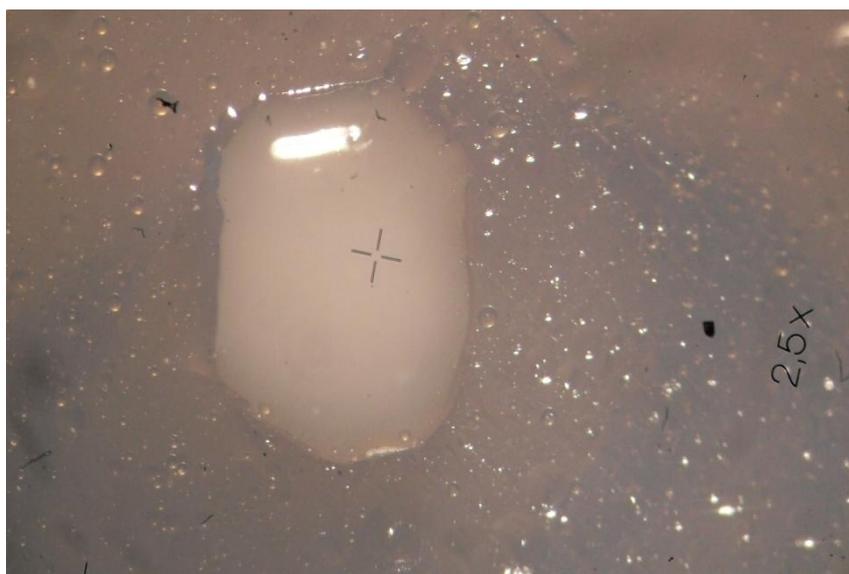


Figura 13 Foto da colônia isolada de *Klebsiella oxytoca* (Flugge 1886) Lautrop 1956.

5.5 Otimização do Processo de Remoção de Gordura

A matriz experimental para o primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR) é ilustrada na Tabela 13, com os níveis de cada fator e as variáveis respostas obtidas quanto ao pH, à remoção de O&G, à remoção de DQO, à acidez e à atividade lipásica, no decorrer dos 11 ensaios executados aleatoriamente.

Tabela 13 Matriz do primeiro planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto a pH, remoção de O&G, remoção de DQO, acidez e atividade lipásica

Ensaio	Fatores				Variáveis resposta				
	pH		Concentração de Nitrogênio (g.L ⁻¹)		pH	Ef. Rem. O&G (%)	Ef. Rem. DQO (%)	Acidez (%)	At. Lip. (U.mL ⁻¹)
1	1	7,02	1	3,24	4,06	72,09	37,53	19,125	0,25
2	1	7,02	-1	1,44	3,91	58,68	35,34	16,245	0,23
3	-1	4,68	1	3,24	3,94	79,88	40,03	14,715	0,32
4	-1	4,68	-1	1,44	3,93	78,40	36,90	12,645	0,18
5	-1,41	4,2	0	2,49	4,23	92,21	40,35	9,765	0,22
6	1,41	7,5	0	2,49	3,86	64,00	46,92	18,945	0,08
7	0	5,85	-1,41	0,77	3,82	87,18	37,22	11,565	0,08
8	0	5,85	1,41	3,24	3,88	69,03	36,59	16,785	0,40
9	0	5,85	0	2,49	3,85	79,98	32,52	15,975	0,22
10	0	5,85	0	2,49	3,9	78,99	18,43	16,785	0,20
11	0	5,85	0	2,49	3,92	78,60	32,21	16,065	0,23

Com os resultados experimentais (Tabela 13), obteve-se um modelo de regressão, avaliando-se a variável resposta remoção de O&G, com os parâmetros avaliados. O modelo,

ilustrado na Equação 3, apresentou $R^2 = 0,32$, ou seja, apenas 32% da remoção de gordura no tratamento da água residuária de purificação do biodiesel é explicada pelo modelo.

Na obtenção da Equação 3 foram considerados apenas os fatores com $p\text{-valor} < 0,05$. A estimativa dos efeitos em relação à remoção de O&G é ilustrada no diagrama de Pareto (Figura 14). Os efeitos que estão além da linha tracejada ($p\text{-valor} = 0,05$) são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

$$\begin{array}{l} \text{Eficiência de} \\ \text{Remoção de O\&G} \end{array} = 79,21 + 1,54 \text{ pH} - 2,02 \text{ pH}^2 + 5,07 [\text{N}] - 2,02 [\text{N}]^2 + 2,98 \quad (3)$$

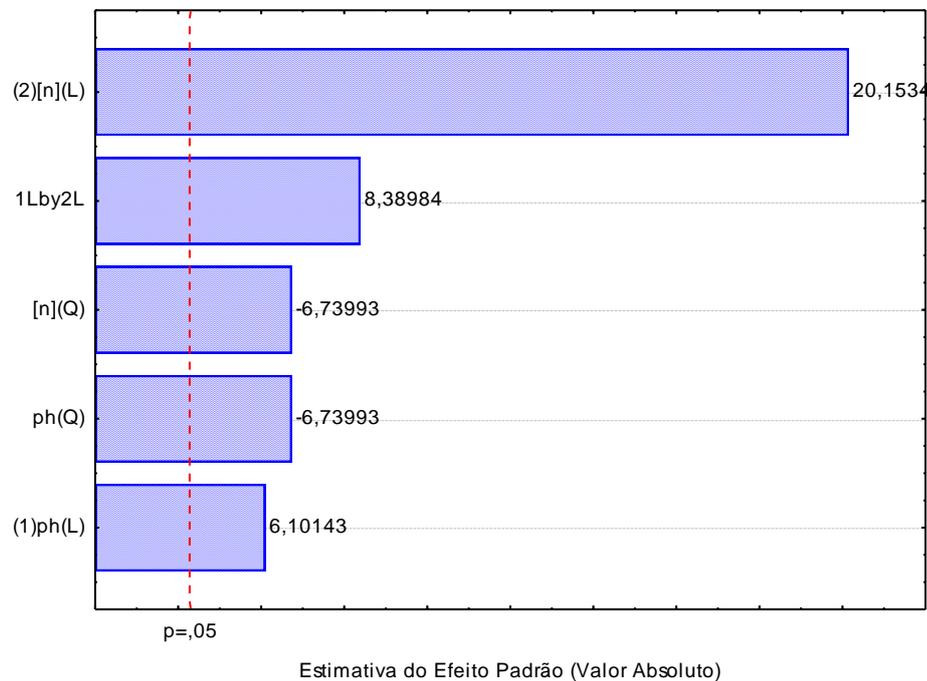


Figura 14 Diagrama de Pareto para eficiência de remoção de gordura.

Observa-se na Equação 3 que o coeficiente das variáveis pH e concentração de nitrogênio apresentaram coeficientes positivos, significando que a remoção de gordura do efluente foi favorecida com os maiores valores destas variáveis.

Nas Figuras 15 e 16 são mostrados o comportamento do pH e da concentração de nitrogênio na remoção de gordura, por meio do gráfico de superfície de resposta e gráfico de contorno.

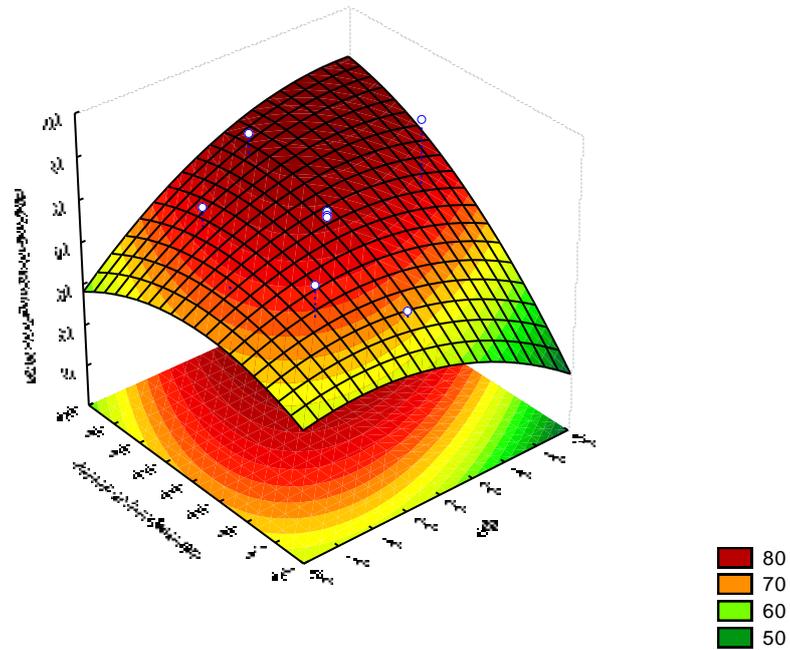


Figura 15 Gráfico de superfície de resposta obtido com os dados de eficiências de remoção de O&G, avaliando as variáveis pH e concentração de nitrogênio.

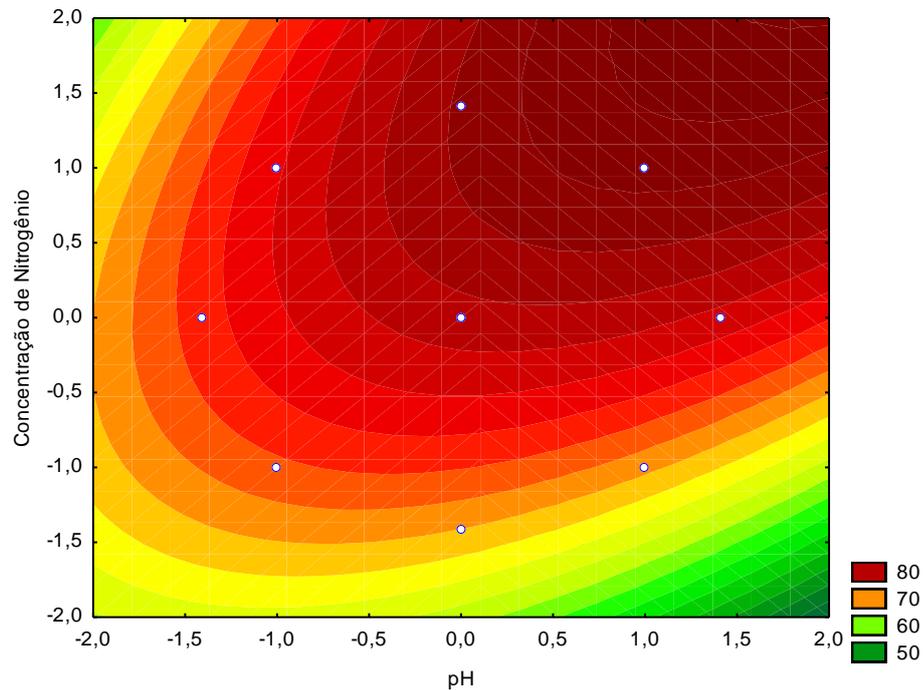


Figura 16 Gráfico de contorno obtido com os dados de eficiências de remoção de O&G, avaliando as variáveis pH e concentração de nitrogênio.

Nas Figuras 15 e 16, observa-se que a tendência para melhorar a eficiência de remoção de O&G do efluente tratado ocorre com o aumento do valor do pH e a

concentração de nitrogênio do resíduo, porém baseando-se nestes gráficos não é possível determinar o ponto de máxima remoção de gordura.

Assim, como na análise dos dados obtidos no primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR) não foi possível obter as melhores condições de remoção de gordura da água residuária em estudo, projetou-se um segundo DCCR, em que os pontos das amostras foram calculados, com base no caminho de máxima inclinação, com uma distância maior entre os pontos, para evitar que todos os pontos ficassem num platô e não se verificasse a curvatura na superfície resposta.

A matriz experimental para o DCCR é ilustrada na Tabela 14, com os níveis de cada fator e as variáveis respostas obtidas quanto ao pH, remoção de O&G, remoção de DQO, acidez e atividade lipásica, no decorrer dos 11 ensaios executados.

Tabela 14 Matriz do segundo planejamento DCCR com os fatores (codificados e reais) e respostas quanto a pH, remoção de O&G, remoção de DQO, acidez e atividade lipásica

Ensaio	Fatores				Variáveis resposta				
	pH		Concentração de Nitrogênio (g.L ⁻¹)		pH	Ef. Rem. O&G (%)	Ef. Rem. DQO (%)	Acidez (%)	At. Lip. (U.mL ⁻¹)
1	1	8,5	1	5,42	5,96	73,77	39,72	15,51	0,33
2	1	8,5	-1	2,58	5,97	54,44	36,59	13,07	0,21
3	-1	6,5	1	5,42	5,09	83,14	24,07	17,30	0,33
4	-1	6,5	-1	2,58	5,3	49,01	35,65	13,82	0,16
5	-1,41	6,09	0	4,00	5,02	60,75	28,45	17,01	0,24
6	1,41	8,91	0	4,00	60,7	67,75	41,29	12,97	0,25
7	0	7,5	-1,41	2,00	5,89	50,00	20,63	11,84	0,16
8	0	7,5	1,41	6,00	5,72	49,90	26,89	18,05	0,33
9	0	7,5	0	4,00	5,73	79,98	42,54	16,64	0,24
10	0	7,5	0	4,00	5,65	77,91	40,35	14,85	0,25
11	0	7,5	0	4,00	5,88	76,33	36,28	14,48	0,25

Com os resultados experimentais obtidos na avaliação do segundo DCCR (Tabela 14), obteve-se um novo modelo de regressão, avaliando a variável resposta remoção de O&G, com os parâmetros avaliados. O modelo está ilustrado na Equação 4, e apresentou $R^2 = 0,67$, ou seja, apenas 67% da remoção de gordura no tratamento da água residuária de purificação do biodiesel é explicada pelo modelo.

Na obtenção da Equação 4 foram considerados somente os fatores com $p\text{-valor} < 0,05$. A estimativa dos efeitos, em relação à remoção de O&G, é ilustrada no diagrama de Pareto (Figura 17). Os efeitos que estão além da linha tracejada ($p\text{-valor} = 0,05$), são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

$$\text{Eficiência de Remoção de O\&G} = 78,04 - 4,90 \text{ pH}^2 + 6,68 [\text{N}] - 12,09 [\text{N}]^2 \quad (4)$$

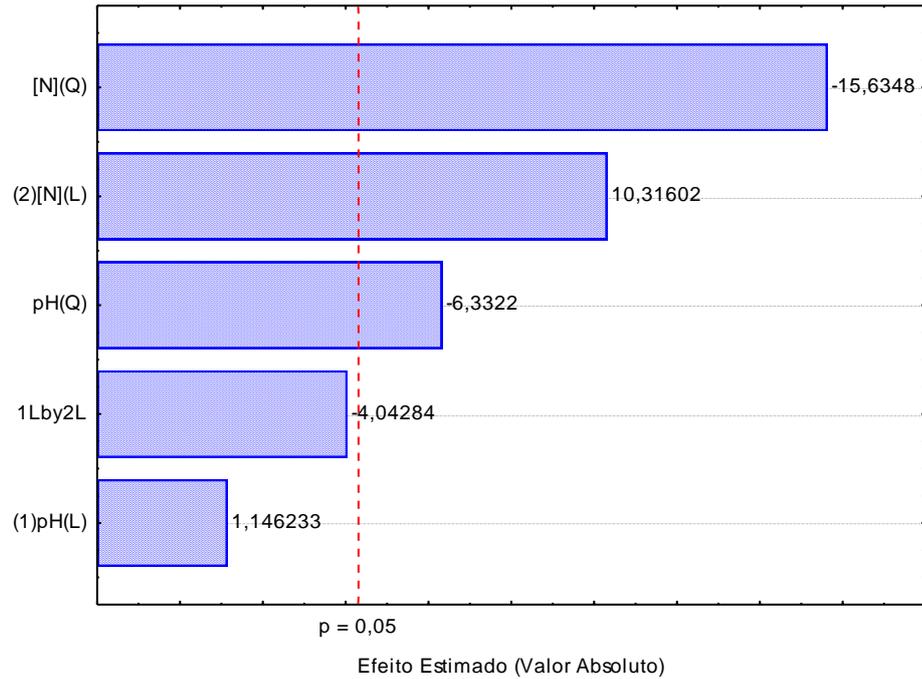


Figura 17 Diagrama de Pareto para eficiência de remoção de gordura (2º DCCR).

Nas Figuras 18 e 19 visualizam-se o comportamento do pH e da concentração de nitrogênio na remoção de gordura, pelo gráfico de superfície de resposta e gráfico de contorno. Por meio destes gráficos, pode-se verificar o ponto de máxima remoção de gordura em torno de 60%.

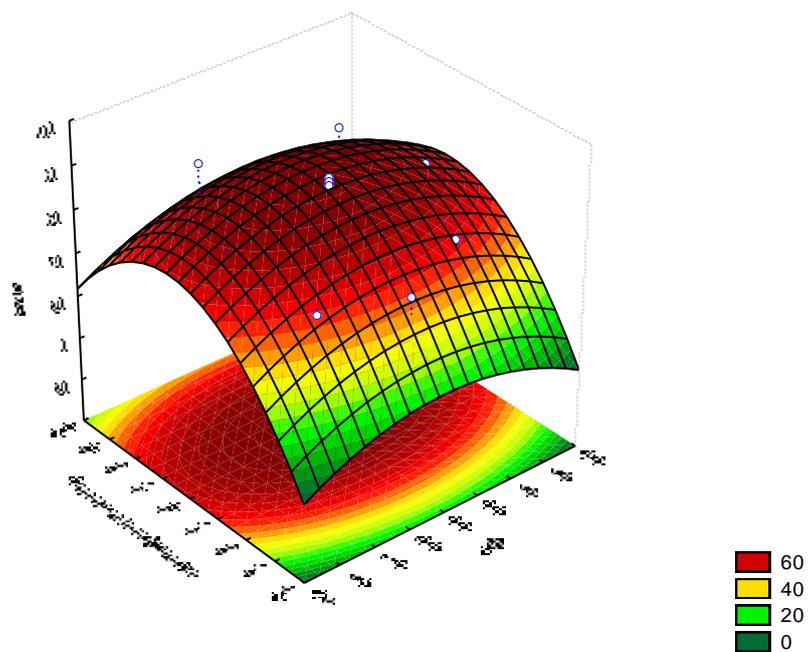


Figura 18 Gráfico de superfície de resposta da eficiências de remoção de O&G, avaliando as variáveis pH e concentração de nitrogênio (2º DCCR).

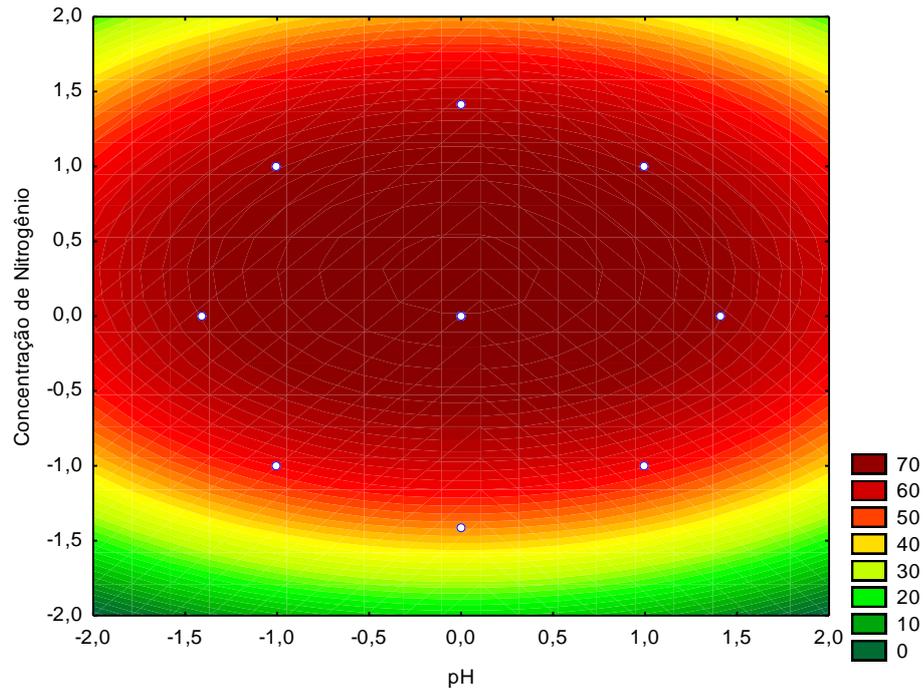


Figura 19 Gráfico de contorno obtido com os dados de eficiências de remoção de O&G, avaliando as variáveis pH e concentração de nitrogênio (2º DCCR).

Com base no gráfico de superfície de resposta, obteve-se um gráfico de desejabilidade (Figura 20), no qual são determinados os pontos de pH e concentração de nitrogênio ideais para obtenção da melhor eficiência de remoção de O&G, ou seja, o ponto de máxima eficiência do processo. Estes pontos correspondem ao ponto central utilizado no segundo delineamento composto central rotacional, equivalentes ao pH 7,5 e 4,00 g.L⁻¹ de nitrogênio.

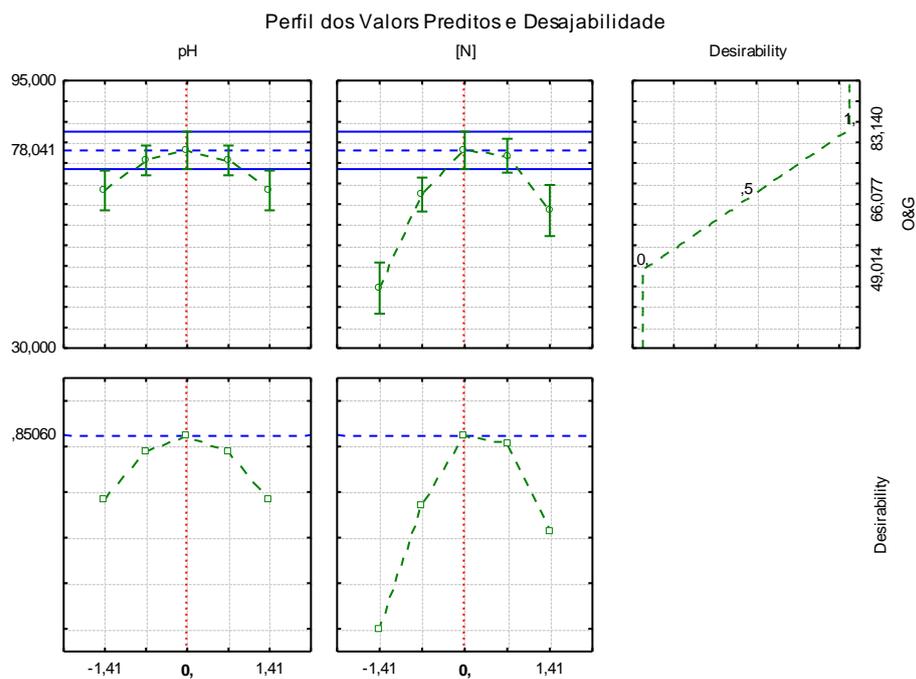


Figura 20 Perfil de desejabilidade para determinação do ponto ótimo de remoção de O&G da água residuária de purificação de biodiesel.

5.6 Ensaio Final de Degradação de Lipídios

A validação experimental da remoção de O&G foi realizada em triplicata nas condições otimizadas pré-determinadas: pH 7,5 e 4,00 g.L⁻¹ de nitrogênio, durante 96 h, tendo como variáveis resposta pH, remoção de O&G, remoção de DQO, acidez e atividade lipásica. A título de comparação, realizaram-se os mesmos ensaios, com as mesmas condições determinadas para a cepa *Klebsiella oxytoca* (inóculo A), com o produto comercial Hável FTW SF, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 Média dos parâmetros avaliados para o micro-organismo *Klebsiella oxytoca* e o Produto comercial no tempo de 12 a 96 h

Inóculo	Tempo	pH			Rem. O&G (%)			Rem. DQO (%)			Acidez (A%)			At. Lipasica U/mL.min		
		Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12	6,42	0,23	3,51	52,07	5,99	11,51	72,99	2,05	2,81	10,80	0,27	2,47	0,35	0,02	4,47
	24	6,40	0,04	0,56	63,68	7,39	11,61	69,70	1,81	2,59	11,65	0,13	1,15	0,26	0,02	8,72
	48	5,94	0,10	1,70	56,15	3,37	5,99	75,60	3,43	4,54	12,81	0,58	4,55	0,30	0,04	11,86
	72	5,57	0,32	5,81	58,88	1,92	3,27	75,08	0,63	0,84	14,66	0,27	1,82	0,31	0,00	0,97
	96	4,98	0,06	1,14	65,53	5,51	8,41	78,47	3,32	4,23	16,55	0,16	0,99	0,32	0,02	6,73
Produto Hável FTW SF	12	5,45	0,14	2,51	64,30	8,44	13,12	74,50	2,44	3,27	14,82	1,89	12,79	0,35	0,03	8,82
	24	4,09	0,12	2,82	56,18	8,79	15,64	73,88	0,65	0,88	19,06	0,48	2,53	0,38	0,04	9,45
	48	3,92	0,27	6,85	48,87	10,53	21,55	76,43	0,44	0,58	19,68	0,00	0,00	0,30	0,03	9,45
	72	3,94	0,09	2,34	73,32	0,21	0,29	84,65	6,97	8,24	22,34	1,80	8,06	0,35	0,03	9,43
	96	3,02	0,00	0,00	68,08	5,96	8,75	84,94	4,94	5,81	24,43	8,73	35,73	0,36	0,03	9,37

Notas: DP: Desvio Padrão;

CV: Coeficiente de Variação.

Na Tabela 16 apresenta-se o teste de ANOVA, tendo como variável resposta o teor de óleos e graxas (O&G) e variáveis preditoras: o inóculo utilizado e o tempo de incubação. Neste teste, pode-se verificar que nenhuma das variáveis apresentou-se estatisticamente significativa, a 5% de probabilidade.

Tabela 16 Análise de variância (ANOVA) para o teor de O&G

	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Soma das Médias	F	p
Tempo	114436,3	1	114436,3	665,52	0,00
Inóculo	423,9	4	106,0	0,62	0,66
Tempo*inóculo	81,7	1	81,7	0,48	0,50
Erro	532,3	4	133,1	0,78	0,55

Na Figura 21 apresenta-se a cinética da remoção do teor de O&G, ao longo de 96 h de incubação, para o micro-organismo selecionado e o produto comercial utilizado. Com base nestes dados pode-se notar que, apesar de não diferirem estatisticamente, o produto utilizado apresentou uma remoção de gordura superior ao micro-organismo, estando os dois inóculos numa faixa média de redução em torno dos 60%.

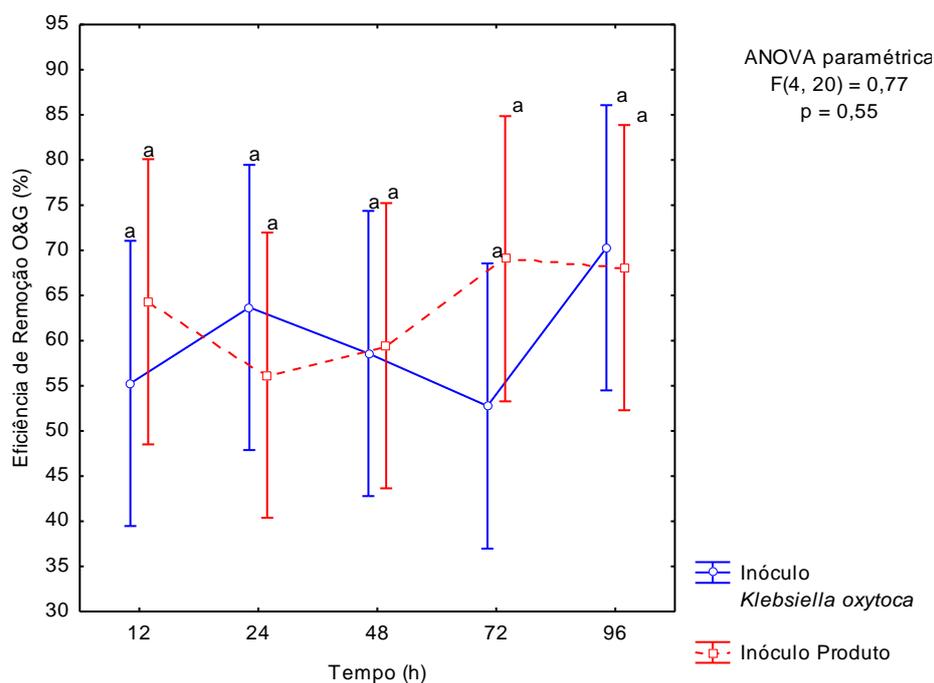


Figura 21 Cinética final da redução do teor de O&G.

Nota: *Letras semelhantes indicam ausência de diferenças significativas ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey a posteriori.

Semelhante aos resultados encontrados neste estudo, a remoção de lipídeos de efluentes gerados em restaurantes foi verificada por WAKELIN & FORSTER (1997), empregando culturas puras das espécies *Anicetobacter* sp., *Rhodococcus rubra*, *Nocardia amarae* e *Microthrix parvicella*, em lodo ativado aclimatado e não-aclimatado. A espécie *Anicetobacter* sp. foi a mais eficiente das culturas puras, removendo 60-65% do teor de lipídeos, com uma concentração inicial de 8 000 mg.L⁻¹.

DURLI (2007), com o objetivo de reduzir o teor de gordura contido no efluente de indústria de laticínio, empregou lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11 e encontrou uma eficiência de remoção de gordura similar em seu estudo. A máxima remoção de O&G, prevista pelo modelo, foi de 60% após 48 h, nas condições de 29 a 32 °C, pH 8,0 a 9,2 e atividade enzimática adicionada no efluente de 47,2 U.L⁻¹.

JEGANATHAN, BASSI & NAKHLA (2006) reportaram remoção de O&G entre 40 e 60%, ao final de três dias de tratamento do efluente de indústria de alimentos de animais domésticos com lipases imobilizadas de *Candida rugosa*.

Quanto à eficiência de remoção de DQO, os valores encontrados nesta pesquisa situam-se entre 70 e 80%. MENDES, PEREIRA & CASTRO (2006), estudando a biodegradação de água residuária de laticínio previamente tratada por lipase, em 24 h de hidrólise, o efluente submetido à biodigestão anaeróbica, obtiveram 80,9 e 77,5% de redução de cor e DQO, respectivamente.

A espécie *Penicillium* P4, isolada de um efluente da indústria de óleo de oliva, foi estudada para a biodegradação deste efluente, contendo 114.000 mg.L⁻¹ de DQO. Após 20 dias de incubação a 28 °C, observou-se uma redução de 61% na DQO inicial do efluente (ROBLES *et al.*, 2002).

A respeito da atividade lipásica produzida pelo micro-organismo do inóculo A e pelo produto comercial, os valores ficaram entre 0,26 e 0,38 U.mL⁻¹, semelhantes a diversas pesquisas que avaliaram a produção de lipase por diferentes micro-organismos, conforme se verifica em alguns exemplos citados a seguir.

MAIA *et al.* (2001) avaliaram a atividade lipolítica do fungo *Fusarium solani* também cultivado a 28 °C e 120 rpm, testando diferentes tipos de óleo como fontes de carbono. Os resultados encontrados variaram entre 0,06 e 0,45 U.mL⁻¹, sendo a maior atividade lipolítica determinada com o óleo de sésamo como fonte de carbono e pH 7,8.

CORZO & REVAH (1999) analisaram a influência dos parâmetros temperatura, pH e tempo de incubação na atividade específica da levedura *Yarrowia lipolytica* pelo método de titulação de ácidos graxos liberados. Nas condições de pH 6 e temperatura 30 °C, mais próximas das condições deste trabalho, foram encontradas atividades específicas de 2,0 ± 0,1 U.mL⁻¹, tanto a 48 como a 60 h de incubação. Nas mesmas condições, porém à

temperatura de 34 °C, a atividade lipolítica reduziu para $1,4 \pm 0,0 \text{ U.mL}^{-1}$ a 48 h e $0,8 \pm 0,0 \text{ U.mL}^{-1}$ a 60 h de incubação. Um maior tempo de incubação proporcionou um aumento na biomassa, mas não necessariamente na produção de lipase.

RAHMAN *et al.* (2007) isolaram 29 cepas bacterianas potencialmente lipolíticas de efluente de indústria de óleo de palma. A maior atividade lipolítica encontrada, após 24 h de incubação a 70°C, foi de $0,15 \text{ U.mL}^{-1}$ para a cepa identificada como *Geobacillus zalihae*.

FALCONE (2009), avaliando a lipase bacteriana e visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento, verificou que, de 24 cepas bacterianas isoladas, sendo 17 provenientes de amostras de espuma de caixa de gordura residencial e 7 de espuma de caixa de gordura do Restaurante Universitário da UFES, 19 bactérias apresentaram atividade lipolítica que variou de 0,02 a $3,25 \text{ U.mL}^{-1}$.

Comparando os valores obtidos pelos autores citados acima com os apresentados neste trabalho, verifica-se que, nas condições estudadas, a otimização do processo permitiu atingir uma eficiência de tratamento da água residuária de lavagem do biodiesel semelhante a experimentos de tratamento de outros efluentes, estudados por outros pesquisadores.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a água residuária de purificação do biodiesel apresenta alto potencial de impacto ambiental e necessita de um tratamento eficiente para se enquadrar nos padrões de lançamentos exigidos pelo CONAMA, destaca-se o teor de óleos e graxas (O&G) com uma concentração de $6,76 \text{ g.L}^{-1}$.

Das seis culturas microbianas isoladas do tanque decantação, onde ocorreu à coleta deste efluente, dois micro-organismos foram selecionados apresentando um alto potencial de produção de lipase, com índice enzimático de 0,56 e 0,57. Estes micro-organismos são, portanto, indicados para a realização de estudos posteriores, com o intuito de serem utilizados no pré-tratamento de remoção de gordura da água residuária de purificação do biodiesel, uma vez que já se apresentam adaptados ao resíduo com características específicas.

Pelo delineamento dos pontos centrais rotacionais desenvolvidos neste experimento, conclui-se que o ponto ótimo para máxima eficiência de remoção de O&G da água residuária de purificação do biodiesel foi equivalente ao pH 7,5 e $4,00 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrogênio adicionado ao resíduo, obtendo-se uma eficiência de 60% no processo, valores obtidos em temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 180 rpm. A remoção de lipídeos no efluente de indústria de biodiesel foi promissora, considerando-se as correções no efluente industrial e a pequena escala utilizada no experimento.

Considerando os resultados da cinética final do experimento, o tratamento da água residuária, utilizando o micro-organismo *Klebsiella oxytoca*, isolado a partir do próprio efluente, não se diferenciou dos ensaios realizados utilizando o produto comercial Hábil FTW SF, aplicado no tratamento de efluentes gordurosos, indicando, assim, a boa eficiência do produto, como parte de um sistema de tratamento, removendo cerca de 60% do teor de O&G.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para futuros trabalhos sugere-se a análise de outras variáveis que possam interferir no sistema biológico de degradação dos óleos e graxas do efluente e as suas interações com as variáveis já avaliadas: pH e concentração de nitrogênio. Dentre essas variáveis pode-se citar: temperatura, agitação, fonte de nitrogênio e concentração de outros nutrientes, como fósforo e potássio.

Recomenda-se a avaliação da remoção de gordura do efluente com outros micro-organismos, já definidos pela literatura como produtores de lipase.

Recomenda-se também avaliar a viabilidade financeira da aplicação do sistema de pré-tratamento proposto, em escala real numa indústria produtora de biodiesel.

REFERÊNCIAS

ACCARINI, J. H. Biodiesel no Brasil: estágio atual e perspectivas. **Bahia Análise & Dados**, Salvador, v. 16, n. 1, p. 51-63, 2006.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP. **Gás natural e biocombustíveis**. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em: 10 maio 2010.

ALESSI, M. C. M. **Avaliação da hidrólise alcalina da gordura sobre a biodegradação anaeróbia de soro de queijo**. 2005. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2005.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 15. ed. Washington, D.C: APHA, 1995. 1134 p.

ANDRETTA, V.; DAMSCHI JUNIOR, L. I.; ONOFRE, S. B. Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases de águas residuárias de laticínios. **Biology & Health Journal**, Dois Vizinhos, v. 1, n. 1/2, 2007.

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**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 295-304, 2006.

AZBAR, N.; YONAR, T. Comparative evaluation of a laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater. **Process Biochemistry**, Vandoeuvre-les-Nancy, v. 39, p. 869-875, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Pesquisa desenvolvimento na ciência e na indústria. 3. ed. Campinas/SP: Editora da Unicamp, 2007.

BARROS, A. A. C.; WUST, E.; MEIER, H. F. Estudo da viabilidade técnica-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 255-262, jul./set. 2008.

BRASIL. **Lei no. 11.097, de 13 de janeiro de 2005**. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs. 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002 e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm. Brasília, DF. Acesso em: 10 maio 2010.

BROZZOLI, V.; CROGNALE, S.; SAMPEDRO, I.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A.; PETRUCCIOLI, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bech-top reactor. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 100, p. 3395-3402, 2009.

CANDEIA, R. A. **Biodiesel de soja: síntese, degradação e misturas binárias**. 2008. 150 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008.

CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, São Paulo. v. 18, p. 544-554, 1995.

CHRISTOFF, P. **Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial estudo de caso: Guaratuba, litoral paranaense**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Tecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Tecnologia, Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento – LACTEC, Curitiba, 2007.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. Legislação Ambiental Federal, **Resolução nº 357**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providências. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf. Acesso em: 10 maio 2009.

CORZO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 70, p. 173-180, 1999.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de Biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

COSTA, M. J. C.; SOUZA, J. T.; LEITE, V. D.; LOPES W. S.; SANTOS, K. D. Co-digestão anaeróbia de substâncias surfactantes, óleos e lodo de esgoto. **Engenharia Sanitária Ambiental**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 433-439, 2007.

DARTORA, D. F.; HENDGES, D. H.; SANGALETTI, N.; OLDONI, T. L. C.; ALENCAR, S. M.; ONOFRE, S. B. **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipases a partir do soro de queijo**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES – SINAFERM, 14, 2003, Florianópolis. **Anais...**, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. v.1, p. 1-2. 1 CD-ROM.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A-General**, Netherlands, v. 281, n. 1-2, p. 225-231, 2005.

DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; MARTINS, R. C.; ROCHA, W. L.; DIAS, A. P. Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. **Biotechnology Applied Biochemistry**. Indianapolis, USA, v. 26, p. 111-116, 1997.

DRANKA, G. G.; FAUSTO, G. L.; RODRIGUES, M. B. Avaliação do Potencial Impactante da água residuária do processo de produção do biodiesel. ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, SBQSul, 16.. 2008. . **Anais...**, FURB, 2008. p. 1-2.

DURLI, E. **Tratamento de efluente de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB11**. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA SOJA. **Tecnologia de produção de soja – Paraná 2007**. Londrina, PR, 2006. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/parana2007>>. Acesso em: 7 fev. 2007.

FALCONE, C. O. **Avaliação de lipase bacteriana visando sua Utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento.** 2009. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de Engenharia Ambiental) - Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** 2007. 131 f. Tese. (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná – PR, Curitiba, 2007.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, São Paulo, v. 1, p.19, 2005.

FIORETTO, A. M. **Viabilidade de cultivo de *trichosporon sp* em manipueira.** 1987. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1987.

FREITAS, S. M. de. Biodiesel à base de óleo de soja é a melhor alternativa para o Brasil? **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 86-89, 2004.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p.1369-13373, 2007.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 86, p. 1097-1107, 2005.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental.** 14. ed. Piracicaba: Degaspari, 2000. 477 p.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por levedura em cultivo submerso.** 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Philadelphia, v. 67, p. 597-607, 1975.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, England, v. 22, p. 205-209, 1971.

JEGANATHAN, J.; BASSI, A.; NAKHLA, G. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. **Journal of Hazardous Materials**, Porto, v. 137, p. 121-128, 2006.

LEAL, M. C. M. R. **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios.** 2000. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2000.

LEE, K.; FOGLIA, T. A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **JAOCs**, Champaign, v. 79, p. 191-195, 2002.

LOPERENA, L.; FERRARI, D.; DÍAZ, A. L.; INGOLD, G.; PÉREZ, L. V.; CARVALLO, F.; TRAVERS, D.; MENS, R. J.; LAREO, C. Isolation and selection of native microorganisms for the

aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 100, p. 762-1766, 2009.

MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M. M. C.; MELO, E. H. M.; MORAIS JR., M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 76, p. 23-27, 2001.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, England, v. 10, p. 248-268, 2006.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B.; FURGIO JR. A. Aplicação de lipase no tratamento de águas residuárias com elevado teor de lipídeos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p.296-305, 2005.

MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratadas por lipases. **Brazilian Journal Food Technol.**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 143-149, abr./jun. 2006.

OLIVEIRA, E. E.; SILVA, C. S.; SOARES, A. J.; ATTUX, C.; CRUVINEL, B.; SILVA, M. R. R. *Killer* toxin sensitivity and production of enzymes by *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with cancer. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, n. 6, p. 523-527, nov./dez. 1998.

OLIVEIRA, L. B. **Potencial de aproveitamento energético de lixo e de biodiesel de insumos residuais no Brasil**. 2004. 237 f. Tese (Doutorado em Ciências em Planejamento Energético) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Appl. Biochem. And Biotechnol.** Indianapolis-USA, v. 84-86, p. 1137-1145, 2000.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. 1. ed. Fortaleza: Tecbio, 2003, 68 p.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

PEREIRA, E. B. CASTRO, H. F.; FURIGO JUNIOR, A. Hidrólise enzimática do efluente proveniente de frigorífico avícola utilizando lipase de *Candida rugosa*. In: SIMPOSIO NACIONAL DE FERMENTACOES - SINAFERM, 14, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. p. 1-2. 1 CD-ROM.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; DE ANDRADE, J. B. Biodiesel: an overview. **Journal Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; LEOW, T. C.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. *Geobacillus zalihae* sp. nov., a thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. **BMC Microbial**, Londres, v. 7, p. 77-87, 2007.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **LWT - Food Science and Technology**, Zürich, v. 42, p. 985-992, 2009.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 31, p. 28-37. 2003.

ROBLES, A.; LUCAS, R.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; OMAR, N. B.; PÉREZ, R.; GÁLVEZ, A. Characterization of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis paradoxa* CH32). **Enzyme Microb. Technol.**, Netherlands, v. 31, p. 516-522. 2002.

ROSA, D. R. **Tratamento enzimático/biológico de efluentes com alto teor de gordura**. 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SEMIONATO, S.; CUNHA, A. C.; CARDOSO, M. C. M. C.; GONÇALVES, R. F.; CASSINI, S. T. A. Isolamento e caracterização de bactérias lipolíticas em sistema de pré-tratamento de esgoto doméstico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23. Campo Grande, 2005. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2005. p. 18-23.

SIMONNE, A. H.; SMITH, M.; WEAVER, D. B.; VAIL, T.; BARNES, S.; WEI, C.I. Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame), during processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v. 48, p. 6061-6069, 2000.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicérides em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.3, p. 667-676, 2007.

SUEHARA, K.; KAWKMOTO, Y.; FUJII, E. KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, EUA, v. 100, n. 4, p. 437-442, 2005.

UCHIMURA, M. S. **Refino de glicerina**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, 2006. 3 p.

VALLADÃO, A. B. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Enzymatic prehydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Inglaterra, v. 60, p. 219-225, 2007.

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

VIEIRA, T. M.; SILVA, E. P.; FILHO, N. R. A.; VIEIRA, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, Brasília, DF, 2006. **Anais...** Brasília, DF: Prossiga/IBICT, 2006. p. 218-223.

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

WUST, E. **Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos**. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2004.

ZHANG, Y.; DUBE, M. A.; McLEAN, D. D.; KATES, M. Biodiesel production from waste cooking oil: Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, Texas, v. 89, p. 1-16, 2003.