

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THIAGO CAVALCANTI DA SILVA

**TRATAMENTO DE EFLUENTE OLEOSO DE BIODIESEL POR EXTRATO BRUTO  
DE LIPASE FÚNGICA**

RECIFE  
2017

**THIAGO CAVALCANTI DA SILVA**

**TRATAMENTO DE EFLUENTE OLEOSO DE BIODIESEL POR EXTRATO BRUTO  
DE LIPASE FÚNGICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Tratamentos de efluentes

Linha de pesquisa: Produtos biotecnológicos

Orientador: Prof. Dr. Maurício Alves da Motta Sobrinho

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Libânio Silva Reis

Recife  
2017

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Valdicéa Alves, CRB-4 / 1260

S586t Silva, Thiago Cavalcanti da.  
Tratamento de efluente oleoso de biodiesel por extrato bruto de lipase  
fúngica / Thiago Cavalcanti da Silva - 2017.  
105folhas. Il.; Tab.; Abr.; Sig.; e Simb.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Alves da Motta Sobrinho.  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Libânio Silva Reis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2017.  
Inclui Referências.

1. Engenharia Química. 2. Rhizopus oryzae. 3. Controle de poluição.  
4. Catálise enzimática. 5. Biorrefinaria. 6. Biotecnologia. I. Motta Sobrinho,  
Maurício Alves da(Orientador). II. Silva Reis Alexandre Libânio (Coordenador).  
III.Título.

UFPE

660.2CDD (22. ed.)

BCTG/2017 - 196

**THIAGO CAVALCANTI DA SILVA**

**TRATAMENTO DE EFLUENTE OLEOSO DE BIODIESEL POR EXTRATO BRUTO  
DE LIPASE FÚNGICA**

**Área de concentração: Engenharia Ambiental**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 03 de março de 2017 pela banca examinadora, constituída pelos seguintes membros:

---

Prof. Dr. Maurício Alves da Motta Sobrinho – DEQ / UFPE  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Alexandre Libânio Silva Reis/ P&D-CLAEFF  
(Coorientador)

---

Prof. Dr. Alexandre Ricardo Pereira Schuller – DEQ / UFPE  
(Examinador Externo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glória Maria Vinhas – DEQ / UFPE  
(Examinadora Interna)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Los Angeles Perez F. Palha – DEQ / UFPE  
(Examinadora Externa)

*Dedico ao Deus Pai, criador do céu, da terra e de tudo em que há vida. Que nos concede tudo aquilo que necessitamos para sermos felizes. Aquele que nos demonstrou o verdadeiro amor ao entregar Seu único filho como o cordeiro perfeito para nos livrar dos pecados e deixar-nos dignos de ter a oportunidade de dialogar diretamente consigo, “o Senhor dos Senhores”, “o Ômega e o Alfa”, “o Princípio e Fim”. Agradeço-Te eternamente, Deus, por tudo que me concedes. Sempre direi a Ti o quanto sou insignificante sem Tua presença e o quanto preciso do Senhor para ter a sabedoria de tomar as decisões corretas, falar as palavras certas nas horas certas. Obrigado, meu Deus, pelo amor e pela misericórdia que o Senhor tem pela minha alma, mesmo eu sendo pecador. Por sempre estar ao meu lado trilhando o caminho certo que deverei seguir. Obrigado, meu Deus, por tudo!*

## **AGRADECIMENTOS**

### Agradecimento institucional

- Ao Professor Anísio Brasileiro, reitor da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), por todo o suporte teórico e prático fornecido, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento da pesquisa.
- Aos Profs. Drs. Maurício Motta, coordenador do Grupo de Processos e Tecnologias Ambientais (GPTA), e Emmanuel Dutra, coordenador do laboratório de Energia e Biomassa do Departamento de Engenharia Nuclear (DEN), por terem disponibilizado seus laboratórios e materiais de consumo para a geração do presente projeto.
- Ao Engenheiro Cláudio Truchlaeff, diretor da Claeff, pela disposição em oferecer aos seus funcionários a disponibilidade de poderem se aprimorar profissionalmente.
- Ao Engenheiro químico James Melo, coordenador da planta piloto de biocombustíveis do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), por ter fornecido as amostras do efluente e da glicerina residual que foram utilizadas durante a pesquisa.

### Agradecimento pessoal

- Aos docentes, por sempre ministrarem o conteúdo programado da melhor forma possível.
- À Brígida, Thiago Pereira, Luiz Zobi, Kaline Cavalcanti, Eveline e Romero, pelo apoio pessoal e técnico no desenvolvimento da pesquisa.
- Ao Orientador, Dr. Maurício Motta, e ao coorientador, Dr. Alexandre Libânio, pelo suporte dado na implementação do vigente projeto.

### Agradecimento especial

- A Deus, pela grandeza da vida e pelas vitórias que a mim foram concedidas durante todo o período acadêmico.
- Aos familiares, em especial à Ana Carolina, pela paciência e pelo companheirismo em todos os momentos, ajudando-me a evoluir e vencer os obstáculos e comprovando que realmente acertei na mulher que sempre estará ao meu lado.

“[...] porque aqueles que pedem recebem, aqueles que procuram acham; e a porta se abre para quem bate [...]”  
(MATEUS, cap. 7, v. 8).

## RESUMO

O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais ou gorduras animais, álcool e um catalisador. O processo mais utilizado para a síntese do biodiesel é a transesterificação, gerando ésteres monoalquílicos. Durante a produção do biodiesel, há o surgimento de coprodutos indesejáveis e a presença de residuais de matérias primas não processadas que se encontram dissolvidas ao final da reação. Com isso, se faz necessário que ocorra um processo de tratamento dessas impurezas, constituídas por glicerol livre, sabão, além de conter álcool, catalisador e óleo emulsionado que não foram reagidos durante a produção do biodiesel. Este trabalho visa caracterizar o efluente gerado pelo processo de purificação do biodiesel, além de avaliar alternativas de tratamento deste efluente oleoso utilizando um método biotecnológico. O efluente foi caracterizado pelos parâmetros: pH, turbidez, condutividade, DQO, DBO<sub>5</sub>, sólidos totais (fixos, voláteis), sólidos dissolvidos totais, temperatura e teor de óleos e graxas. A lipase utilizada no tratamento do efluente foi produzida originalmente a partir de otimização dos dados obtidos na literatura. O fungo utilizado para a produção da lipase foi o *Rhizopus oryzae* e os melhores resultados experimentais foram modelados com o emprego do planejamento fatorial, que conteve fonte de carbono (glicerina residual), fonte de nitrogênio (peptona e NaNO<sub>3</sub>) e Tween 20 como variáveis do estudo estatístico. A etapa seguinte da pesquisa foi a realização de um novo planejamento fatorial destinado à aplicação dessa lipase visando o tratamento do efluente de biodiesel. Nesse processo, utilizaram-se pH, concentração de goma arábica (solução a 7% m/V) e concentração da lipase como variáveis deste estudo estatístico. Ressalta-se que a remoção do teor de óleos e graxas e DQO do efluente foram avaliadas nesta modelagem estatística. Experimentalmente, foi observado que o efluente coletado apresentava elevado teor de óleos e graxas, DQO e carga orgânica. O planejamento fatorial de produção da lipase constatou que todas as variáveis utilizadas no modelo foram significativas, entretanto, a fonte de carbono foi a que se mostrou a mais importante dentre as demais. A atividade enzimática máxima da lipase obtida foi de 389,62 U.L<sup>-1</sup>. Com relação ao resultado obtido no planejamento fatorial de aplicação da lipase no tratamento do efluente, foi possível verificar que todas as variáveis foram significativas, porém o volume de solução de goma arábica aplicada foi o mais evidenciado, pelo fato de os ensaios que utilizaram a maior aplicação dessa variável terem obtido os menores resultados de TOG e de DQO em comparação a todo o planejamento, 60 mg.L<sup>-1</sup> e 207.783,6 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente. A melhor condição obtida com o tratamento enzimático no efluente de biodiesel resultou numa eficiência de remoção de DQO e de TOG em 29,4% e 99,2% respectivamente. Esses resultados indicam que o tratamento proposto mesmo obtendo remoções consideráveis de DQO e TOG, ainda não permite o descarte deste efluente tratados no meio ambiente, de acordo com a resolução CONAMA 357/2005.

**Palavras-chave:** *Rhizopus oryzae*. Controle de poluição. Catálise enzimática. Biotecnologia



## ABSTRACT

Biodiesel is produced from vegetable oils or animal fats, alcohol and a catalyst. The most used process for the synthesis of biodiesel is the transesterification, generating monoalkyl esters. During the production of biodiesel, occur the appearance of undesirable coproducts and the presence of residuals of raw materials that are dissolved with the product at the end of the reaction. Therefore, it is necessary to have a process of treatment of these impurities, constituted by free glycerol, soap, besides containing alcohol, catalyst and emulsified oil that were not reacted during the biodiesel production. This work aims to characterize the effluent generated by the biodiesel purification process, besides evaluating alternatives for treatment of this oily effluent using a biotechnological method. The effluent was characterized by: pH, turbidity, conductivity, COD, BOD<sub>5</sub>, total solids (fixed, volatile), total dissolved solids, temperature and content of oils and greases. The lipase used in the treatment of the effluent was originally produced from optimization of data obtained in the literature. The fungus used to produce lipase was *Rhizopus oryzae* and the best experimental results were modeled using DOE, using carbon source (residual glycerin), nitrogen source (peptone and NaNO<sub>3</sub>) and Tween 20 as variables for the Statistical study. The next stage of the research was the realization of a new experimental design for the application of this lipase for the treatment of the biodiesel effluent. In this process, pH, gum arabic concentration (7% w / v solution) and lipase concentration were used as variables in this Statistical study. It should be noted that the removal of the oils and grease content and COD of the effluent were evaluated in this statistical modeling. Experimentally, it was observed that the collected effluent presented high content of oils and greases, COD and organic load. The factorial design of lipase production found that all the variables used in the model were significant, however, the carbon source was the most important of the others. The maximum enzymatic activity of lipase obtained was 389.62 U.L<sup>-1</sup>. Regarding the results obtained in the factorial design of lipase application in the treatment of the effluent, it was possible to verify that all the variables were significant, but the volume of solution of gum arabic applied was the most evidenced, since the tests that used the largest Application of this variable obtained the lowest TOG and COD results compared to the whole planning, 60 mg.L<sup>-1</sup> and 207,783.6 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. The best condition obtained with the enzymatic treatment in the biodiesel effluent resulted in a COD removal and TOG removal efficiency of 29.4% and 99.2%, respectively. These results indicate that the proposed treatment, even obtaining considerable removals of COD and TOG, still does not allow the disposal of this effluent treated in the environment, according to CONAMA Resolution 357/2005.

**Keywords:** *Rhizopus oryzae*. Pollution control. Enzymatic Catalysis. Biotechnology

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b>	Fluxograma simplificado para o processo de produção de biodiesel via catálise homogênea em meio alcalino	28
<b>Figura 2 -</b>	Fluxograma do tratamento de efluente de biodiesel com produtos biotecnológicos	45
<b>Figura 3 -</b>	Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo	48
<b>Figura 4 -</b>	Fluxograma de obtenção de lipase bruta microbiana por fermentação submersa	56
<b>Figura 5-</b>	Gráficos 1 e 2: Atividade enzimática da lipase produzida usando o caldo A e o caldo B, constituídos por óleo de soja.	65
<b>Figura 6 -</b>	Gráficos 3 e 4: Atividade enzimática da lipase produzida usando o caldo A e o caldo B, constituídos por azeite de oliva	66
<b>Figura 7 -</b>	Gráficos 5 e 6: Atividade enzimática da lipase produzida usando o caldo A e o caldo B, constituídos por glicerina	67
<b>Figura 8 -</b>	Diagrama de Pareto representando a estimativa dos efeitos provocados pelas variáveis fonte de C, fonte de N e Tween 20 e suas interações no processo de produção da lipase, para um ajuste linear.	70
<b>Figura 9 -</b>	Valores observados vs valores previstos pelo modelo linear, para a variável dependente atividade enzimática	71
<b>Figura 10 -</b>	Superfície de resposta mostrando a concentração da atividade enzimática específica em função das variáveis fonte de C e fonte de N no processo de produção da lipase	72
<b>Figura 11 -</b>	Superfície de resposta mostrando a concentração da atividade enzimática específica em função das variáveis fonte de C e Tween 20 no processo de produção da lipase	72
<b>Figura 12 -</b>	Superfície de resposta mostrando a concentração da atividade enzimática específica em função das variáveis fonte de N e Tween 20 no processo de produção da lipase.	73
<b>Figura 13 -</b>	Diagrama de Pareto representando a estimativa dos efeitos	

	provocados pelas variáveis pH, vol. solução de goma arábica e concentração de lipase aplicada e suas interações no processo de aplicação da lipase no efluente, para um ajuste linear, em função da variável DQO	77
<b>Figura 14 -</b>	Valores observados vs valores previstos pelo modelo linear, para a variável dependente demanda química de oxigênio (DQO) contida no efluente	78
<b>Figura 15 -</b>	Superfície de resposta mostrando a DQO em função das variáveis vol. solução de goma arábica e pH no processo de tratamento do efluente com a lipase	79
<b>Figura 16 -</b>	Superfície de resposta mostrando a DQO em função das variáveis concentração de lipase aplicada e pH no processo de tratamento do efluente com a lipase	79
<b>Figura 17 -</b>	Superfície de resposta mostrando a DQO em função das variáveis concentração de lipase aplicada e vol. solução de goma no processo de tratamento do efluente com a lipase	80
<b>Figura 18-</b>	Diagrama de Pareto representando a estimativa dos efeitos provocados pelas variáveis pH, vol. solução de goma arábica e concentração de lipase aplicada e suas interações no processo de aplicação da lipase no efluente, para um ajuste linear, em função da variável TOG	84
<b>Figura 19 -</b>	Valores observados vs valores previstos pelo modelo linear, para a variável dependente teor de óleos e graxas (TOG) contida no efluente	85
<b>Figura 20 -</b>	Superfície de resposta mostrando o TOG em função das variáveis vol. solução de goma arábica e pH no processo de tratamento do efluente com a lipase	86
<b>Figura 21 -</b>	Superfície de resposta mostrando o TOG em função das variáveis concentração de lipase aplicada e pH no processo de tratamento do efluente com a lipase	86
<b>Figura 22 -</b>	Superfície de resposta mostrando o TOG em função das	

	variáveis concentração de lipase aplicada e vol. solução de goma arábica no processo de tratamento do efluente com a lipase	87
<b>Figura 23 -</b>	PCA Projeção das variáveis no plano do fator	89
<b>Figura 24 –</b>	Projeção das variáveis no plano do fator. Os eixos representam a variabilidade explicada pelos dois fatores principais (F1 e F2)	90
<b>Figura 25 –</b>	Gráfico de dispersão TOG vegetal ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) vs DQO ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), gerado a partir da PCA	91
<b>Figura 26 –</b>	Estudo da degradação de DQO do efluente oleoso com aplicação de lipase	92

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Composição química em ácidos graxos de diversos tipos de óleos vegetais	24
<b>Tabela 2 -</b>	Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial	26
<b>Tabela 3 -</b>	Parâmetros de caracterização do efluente de biodiesel do processo de transterificação alcalina	33
<b>Tabela 4 -</b>	Tipos de tratamentos do efluente de biodiesel, porcentagens de remoção, tempo usado e produtos gerados	35
<b>Tabela 5 -</b>	Metodologias para caracterização de efluentes oleosos de acordo com as metodologias do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2015) e limites de descarte da Resolução CONAMA 430/11.	50
<b>Tabela 6 -</b>	Composição dos caldos nutritivos utilizados na seleção da fonte de carbono	53
<b>Tabela 7 -</b>	Variáveis a serem estudadas no planejamento experimental $2^3$ , referente à produção da lipase	54
<b>Tabela 8 -</b>	Planejamento experimental $2^3$ destinada à produção da lipase	55
<b>Tabela 9 -</b>	Técnica para determinação da atividade enzimática na lipase produzida	57
<b>Tabela 10 -</b>	Quantitativos usados na determinação de proteínas totais na lipase	58
<b>Tabela 11 -</b>	Fatores e níveis do planejamento fatorial $2^3$ para o processo hidrolítico da Lipase	59
<b>Tabela 12 -</b>	Matriz de planejamento fatorial $2^3$ para o processo hidrolítico usando a lipase oriunda da fermentação com o fungo <i>Rizhopus</i>	60
<b>Tabela 13 -</b>	Resultados da caracterização dos efluentes brutos	61
<b>Tabela 14 -</b>	Resultados experimentais de produção de lipase utilizando os caldos A e B	63
<b>Tabela 15 -</b>	Matriz completa do planejamento fatorial $2^3$ para produção de	

	lipase destinada a tratar efluente de biodiesel	69
<b>Tabela 16 -</b>	Análise da variância para o ajuste do modelo empírico aos dados experimentais ( <i>ANOVA</i> )	70
<b>Tabela 17 -</b>	Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para produção da lipase	74
<b>Tabela 18 -</b>	Matriz completa do planejamento fatorial $2^3$ para o tratamento efluente de biodiesel por tratamento enzimático usando o lipase. Resultados de DQO	76
<b>Tabela 19 -</b>	ANOVA para ajuste de um modelo linear para a lipase atuando como agente degradante de DQO	77
<b>Tabela 20 -</b>	Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para o tratamento do efluente a partir da aplicação da lipase, em função da DQO	81
<b>Tabela 21 -</b>	Matriz completa do planejamento fatorial $2^3$ para o tratamento efluente de biodiesel por tratamento enzimático usando o lipase. Resultado de TOG	82
<b>Tabela 22 -</b>	ANOVA para ajuste de um modelo linear para a lipase atuando como agente degradante de óleos e graxas.	84
<b>Tabela 23 -</b>	Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para o tratamento do efluente a partir da aplicação da lipase, em função do TOG	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
CEN	European Committee for Standardization
ASTM	American Society for Testing and Materials
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
MPA	Ministério do Desenvolvimento Agrário
DEQ	Departamento de Engenharia Química
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
TOG	Teor de Óleos e Graxas
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FS	Fermentação submersa
FES	Fermentação no estado sólido
$\text{Aln(OH)m Cl (3n-m)}$	Policloreto de Alumínio
GPTA	Grupo de Processos e Tecnologias Ambientais
NTU	Unidades Nefelométricas de Turbidez
DEN	Departamento de Energia Nuclear
URM	Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco
BDA	Batata Dextrose Agar
DTNB	Ácido Ditionitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ST	Sólidos Totais
STD	Sólidos Totais Dissolvidos
COT	Carbono Orgânico Total
APC	Análise de Componentes Principais

## LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLO	DESCRIÇÃO	UNIDADE
A	Velocidade de agitação	rpm
C	Concentração	mg.L <sup>-1</sup>
T	Temperatura	°C
t	Tempo	h
pH	Potencial Hidrogeniônico	NE
A'	Área	cm <sup>2</sup>
Dcorrente	Densidade da corrente elétrica	mA.cm <sup>-2</sup>
i	Corrente elétrica	A
P	Pressão	atm
T	Turbidez	NTU
C'	Condutividade	μS/cm
'A'	Absorbância	nm



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1	OBJETIVO GERAL .....	20
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
2.1	DEFINIÇÃO, PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DO BIODIESEL..	23
<b>2.1.1</b>	<b>Processo de Produção do Biodiesel.....</b>	<b>27</b>
2.1.1.1	<i>Transesterificação.....</i>	27
2.1.1.2	<i>Esterificação.....</i>	29
2.1.1.3	<i>Processos híbridos.....</i>	29
2.1.1.4	<i>Tecnologias de produção do biodiesel em meio heterogêneo.....</i>	30
2.1.1.5	<i>Biocatálise.....</i>	31
2.2	EFLUENTE DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL.....	32
2.3	PROCESSOS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES OLEOSOS.....	34
2.4	PROCESSOS DE TRATAMENTO DE EFLUENTE DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	34
<b>2.4.1</b>	<b>Tratamentos Eletroquímicos.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Tratamentos Físico-químicos.....</b>	<b>37</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Tratamentos Combinados.....</b>	<b>38</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Tratamentos Biológicos.....</b>	<b>39</b>
2.4.4.1	<i>Lipases.....</i>	40
2.4.4.2	<i>Especificidade das lipases.....</i>	40
2.5	PRODUÇÃO DE LIPASE COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	41
2.6	CINÉTICA ENZIMÁTICA DE PRODUÇÃO DA LIPASE.....	42
2.7	TRATAMENTO DE EFLUENTES OLEOSOS COM LIPASE.....	43
2.8	UTILIZAÇÃO DE GOMA ARÁBICA NA DETERMINAÇÃO DE EFICIÊNCIA LIPOLÍTICA DA LIPASE.....	44
2.9	FLUXOGRAMA GERAL DO TRATAMENTO DO EFLUENTE OLEOSO DE BIODIESEL .....	45
2.10	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	46
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>

3.1	O EFLUENTE.....	49
3.2	A GLICERINA RESIDUAL.....	51
3.3	PURIFICAÇÃO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL.....	51
3.4	A ENZIMA LIPASE.....	51
<b>3.4.1</b>	<b>Micro-organismo.....</b>	<b>52</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Manutenção e Cultivo da Cultura e Estudo para Determinar a Fonte de Carbono a Ser Utilizada na Produção da Lipase.....</b>	<b>52</b>
3.5	PRODUÇÃO DE LIPASE ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA...	53
<b>3.5.1</b>	<b>Determinação da Atividade Enzimática.....</b>	<b>56</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Determinação da Atividade Específica (Determinação Proteínas Totais)...</b>	<b>57</b>
3.6	OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DO EFLUENTE OLEOSO.....	58
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	61
4.2	DETERMINAÇÃO DA FONTE DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DA LIPASE.....	62
4.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL DESTINADO À AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LIPASE.....	68
<b>4.3.1</b>	<b>Planejamento Experimental Fatorial 2<sup>3</sup> de Produção da Lipase.....</b>	<b>68</b>
4.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL REFERENTE AO TRATAMENTO DO EFLUENTE OLEOSO COM A LIPASE EM FUNÇÃO DA REMOÇÃO DA DQO E DO TOG.....	75
<b>4.4.1</b>	<b>Planejamento Experimental Fatorial 2<sup>3</sup> avaliado pelo parâmetro DQO.....</b>	<b>75</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Planejamento Experimental Fatorial 2<sup>3</sup> Avaliado pelo Parâmetro TOG....</b>	<b>82</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Correlação entre os Resultados de Remoção de DQO e TOG do Efluente Pré-tratado com a Lipase.....</b>	<b>88</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Avaliação da Remoção de DQO Aplicando a Lipase e os Insumos Propostos no Planejamento Fatorial em Função do Tempo.....</b>	<b>91</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>93</b>
5.1	CONCLUSÕES.....	93
5.2	PERSPECTIVAS.....	94
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é um biocombustível ecologicamente sustentável, uma vez que os gases emitidos de sua queima integram o ciclo de carbono. Esse combustível insere-se em um novo mercado e é utilizado principalmente na área de transporte. É produzido exclusivamente a partir de derivados de biomassa vegetal ou animal. Apesar de ser usado majoritariamente em veículos, também é eficiente em motores ou célula de combustível utilizada para produção de eletricidade (DEMIRBAS; DEMIRBAS 2011). Os biocombustíveis apresentam fatores positivos quanto à sua aplicação, dentre eles a possibilidade de ser produzido de forma sustentável, devido à variedade de biomassas que podem ser utilizadas como matéria-prima para sua produção, além de apresentarem propriedade biodegradável, o que ajuda consideravelmente a manutenção do meio ambiente (PURPPAN, 2002).

A produção do biodiesel é realizada, principalmente, através do processo de transesterificação das matérias-primas de base oleosa, sejam elas de origem animal ou vegetal (AVELLANEDA; SALVADÓ 2011).

Durante o processo produtivo do biodiesel, os óleos de origem vegetal ou animal são processados em contato com um catalisador, que em sua maioria apresentam propriedades básicas e uma fonte alcoólica de cadeia carbônica curta, como por exemplo, o metanol (DEMIRBAS; DEMIRBAS 2011), gerando assim os ésteres alquílicos como produto principal e glicerina como subproduto (KNOTHE, 2010).

Dentre os diversos processos de produção do biodiesel, o mais utilizado é a técnica de transesterificação por catálise básica. Isso se deve à sua alta taxa de conversão de matéria-prima oleosa em biodiesel utilizando um simples processo reacional, com um curto tempo de produção (MA; HANNA 1999). Na etapa final do processo produtivo, faz-se necessário que ocorra a lavagem do biocombustível gerado, com a utilização de água, com o intuito de remover preliminarmente impurezas contidas no meio. A técnica de purificação do bioproduto prossegue com a utilização do processo de filtração e secagem do biodiesel, removendo assim os residuais e as impurezas que não foram eliminados durante a sua lavagem. Vale salientar que, a depender da quantidade de impurezas contidas no biodiesel, a técnica preliminar de lavagem do produto com água pode ser repetida de duas a cinco vezes, gerando uma considerável quantidade de efluentes,

variando de 20% a 120% em volume, em relação à quantidade de biodiesel produzido (CHAVALPARIT; ONGWANDEE 2009).

Os principais resíduos gerados no processo que ficam dissolvidos na água são: sabões de metais alcalinos, ácidos graxos, residuais de glicerina e álcoois usados no processo produtivo, além de outros contaminantes em percentuais reduzidos (STIDHAM *et al*, 2000). Portanto, as águas residuais geradas no processo de produção do biodiesel são impróprias para serem lançadas em corpos hídricos, havendo, com isso, a necessidade de aplicar tecnologias viáveis com intuito de tratar o citado efluente, deixando-o em conformidade com as legislações em vigência (PATTARALUK *et al*, 2010).

Diante desse cenário, esta pesquisa procurou contribuir para a redução dos danos causados ao meio ambiente pelo efluente oriundo da produção de biodiesel, através do tratamento que visou a degradação dos contaminantes com a consequente redução da demanda química de oxigênio (DQO) e do teor de óleos e graxas (TOG) contidos no mesmo. Espera-se, assim, enquadrar tal efluente nos padrões de descarte e de proteção ambiental, notadamente cumprindo o estabelecido pelas resoluções CONAMA 357/2005 e 430/2011 (GOMES, 2009).

Na literatura, há uma diversidade de técnicas disponíveis para separar o óleo da água em efluentes oleosos, tais como filtração, coagulação, flotação e adsorção. Porém, segundo Shokrollahzadeh *et al*. (2012), as técnicas convencionais de separação de fases não removem os compostos orgânicos solubilizados na fase aquosa. Por isso, os tratamentos biológicos vêm sendo usados e estudados para completar o tratamento da água de produção proveniente da indústria de óleo e gás (CARVALHO, 2014).

De acordo com Suehara *et al* (2005), as aplicações de tratamentos biológicos em efluentes oleosos derivados da produção do biodiesel são eficientes na remoção da carga orgânica em até 85%.

A aplicação da lipase para tratamento de efluentes oleosos é uma alternativa interessante referente às novas tecnologias que estão surgindo destinadas ao tratamento de efluentes oleosos. Entretanto, o custo de sua implantação é, em algumas ocasiões, inviável financeiramente. A alternativa encontrada para evitar essa problemática, consiste em realizar otimizações de processos já desenvolvidos da produção da lipase, com a utilização de matérias-primas de baixo custo, os resíduos agroindustriais, objetivando aumentar o seu rendimento produtivo e melhorar a sua eficiência hidrolítica durante a degradação dos rejeitos oleosos (ROVEDA *et al*, 2010).

A presente pesquisa utilizou o processo de tratamento biotecnológico, a partir do desenvolvimento da tecnologia de produção da lipase por via microbiológica, com a utilização do fungo *Rhizopus oryzae* pelo processo de fermentação submersa (FS). Com desejo de viabilizar economicamente o trabalho proposto, foi utilizada a glicerina residual gerada durante o processo de produção do biodiesel como fonte de carbono, no processo de produção da enzima. A lipase produzida tem como função degradar a carga orgânica contida no efluente oleoso proveniente do processo de produção de biodiesel. Ressalta-se que tanto a glicerina residual quanto o efluente oleoso foram obtidos da planta piloto de produção de biodiesel do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Degradar cargas orgânicas oleosas contidas no efluente da produção de biodiesel proveniente de uma planta piloto que utiliza o processo de transesterificação, através da aplicação de extrato bruto de lipase obtida pela técnica de fermentação submersa utilizando o *Rhizopus oryzae*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efluente oleoso oriundo da planta piloto de produção de biodiesel do CETENE utilizando os métodos contidos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005);
- Produzir lipase microbiana, pelo fungo *Rhizopus oryzae*, utilizando resíduos agroindustriais no meio produtivo e determinar a formulação mais eficiente do caldo nutritivo de produção da enzima, através de um planejamento experimental;
- Aplicar lipase no efluente de biodiesel com interesse em remover contaminantes orgânicos contidos no meio e encontrar as variáveis significativas desse tratamento;
- Otimizar a degradação do efluente oleoso de biodiesel pela lipase produzida, através da determinação da remoção de DQO e TOG vegetal, empregando um planejamento fatorial.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O interesse em se ter uma nova fonte de combustível, com características biodegradáveis, que seja menos prejudicial ao meio ambiente, surgiu em meados do século passado, a partir de problemáticas do abastecimento do petróleo. Essa crise foi intensificada pelos conflitos geopolíticos em regiões do Oriente Médio, onde estão situados os maiores produtores e exportadores mundiais de petróleo (RAMOS, 2011).

Outros fatores que influenciaram na busca de novas tecnologias de obtenção de um novo combustível, sustentável, foram o aumento do valor dos combustíveis derivados do petróleo, os onerosos custos de produção e prospecção de áreas de extração e o elevado prejuízo ao meio ambiente, proveniente dos residuais poluidores originados da queima dos combustíveis fósseis, que estão acarretando o aumento na temperatura média do planeta (efeito estufa). Ressalta-se que este último fato está interferindo ativamente na distribuição e intensidade das chuvas, resultando numa ameaça a algumas espécies animais e vegetais, além de a produção e exploração do petróleo impactarem negativamente o ar, o solo e a água (MARTINS *et al.*, 2015; SHAY, 1993; PETERSON, 1998).

Esses fatos revelam a necessidade de se desenvolverem novas alternativas energéticas. Dentre as possibilidades, encontra-se como sustentável a geração de biocombustíveis líquidos derivados de óleos vegetais (RAMOS, 2007).

Os primeiros estudos sobre a utilização de óleos vegetais como combustível foram aplicando diretamente o óleo em sua forma natural nos motores veiculares; entretanto, devido à sua alta viscosidade, houve não conformidades, como o surgimento de gomas nos óleos estocados, por conta de reações de oxidação e polimerização da matéria-prima oleosa. Outros fatores que comprovaram a ineficiência da utilização do óleo *in natura* como combustível foram a obstrução dos filtros de óleo e bicos injetores; a redução parcial do combustível no lubrificante; a redução da durabilidade do motor e, conseqüentemente, o aumento em seus custos de manutenção; além da geração de acroleína durante a combustão, componente este altamente tóxico e cancerígeno, formado a partir da decomposição térmica do glicerol (RAMOS *et al.*, 2003; FELIZARDO, 2011).

A partir da concessão de uma patente depositada na Bélgica em 1937, detentora do nº 422.877, concedida ao pesquisador Charles Chavanne, da Universidade de Bruxelas, surgiu o primeiro documento referente ao desenvolvimento de uma tecnologia de produção de um biocombustível, a partir da geração de ésteres etílicos obtidos do óleo de palma por transesterificação em meio ácido, descritos na patente como um combustível similar ao diesel de petróleo. Entretanto, o termo *biodiesel* foi publicado pela primeira vez em um trabalho chinês de 1988, sendo posteriormente utilizado em um artigo de 1991, momento a partir do qual se tornou de uso comum (KNOTHE *et al.*, 2006).

A alternativa encontrada para resolver a problemática referente à viscosidade dos óleos vegetais, que varia entre 27-35 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, visando sua utilização como combustível, foi usar o processo de transesterificação nas fontes de óleo, gerando ésteres monoalquílicos, com viscosidades cinemáticas na ordem de 4-5 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, ou seja, bem semelhantes à do diesel de petróleo, que é de 1,8-3,0 mm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. Com o uso de biodiesel, não há necessidade de usar adaptações em motores, desde que se utilizem sistemas de injeção de alta pressão ou preaquecimento (SCHUCHARDT *et al.*, 2001; ARRUDA BOTELHO, 2012).

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) é o órgão que fiscaliza todas as especificações padrões do biodiesel no Brasil, por intermédio da Resolução ANP nº 07/2008. No continente Europeu, o biodiesel é fiscalizado pela European Committee for Standardization (CEN), através da norma EN 14214. Já nos Estados Unidos, a norma que rege o biodiesel é a ASTM D6751, da American Society for Testing and Materials (ASTM) (ANP, 2016).

De acordo com os dados apresentados em 2016 pelo Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), o Brasil ocupou a terceira posição mundial em produção e consumo de biodiesel, com um total de 2,7 bilhões de litros em 2015, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da Alemanha. A partir de estudos estatísticos de pesquisa realizados pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), constatou-se que a soja ainda é a mais utilizada matéria-prima produtora de biodiesel, alcançando aproximadamente 78,0% da produção nacional, seguida do sebo bovino com 16,0%; do óleo de semente de algodão, com 3,5%, e de outras matérias-primas, com 2,5% do total produzido no referido ano (ANP, 2016).

## 2.1 DEFINIÇÃO, PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DO BIODIESEL

De acordo com Stamenkovik *et al.* (2011), o conceito de biodiesel consiste em uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos de cadeia carbônica longa, proveniente de derivados de óleos vegetais ou gorduras animais. Ele é classificado como biocombustível devido ao fato de ser produzido a partir de matéria orgânica, podendo ser aplicado diretamente em motores de ignição por compressão (ROBLES-MEDINA *et al.*, 2009). O método convencional de produção do biodiesel consiste no processo de transesterificação de óleos, com álcool de cadeia curta, utilizando-se catalisadores que podem ser homogêneos, heterogêneos ou enzimáticos.

O biodiesel pode ser produzido por qualquer óleo vegetal, entretanto há algumas restrições para óleos classificados como não ideais para esse processo, tais como os óleos que apresentam alto índice de iodo, devido ao fato de tornar o biodiesel gerado mais vulnerável à oxidação, o que torna o produto inadequado a ser aplicado em motores desse segmento. Tal fato, porém, pode ser resolvido com a adição de agentes antioxidantes, mas isso acaba inviabilizando financeiramente a produção do bioproduto (DOMINGOS, 2007).

Uma outra problemática que pode ocorrer na produção do biodiesel é a utilização de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos saturados, pois isso pode gerar a solidificação do biocombustível quando submetidos a baixas temperaturas, ocasionando o aumento da viscosidade dos seus ésteres saturados. Tal fato pode provocar o entupimento dos filtros de óleo e do sistema de injeção (KUCEK *et al.*, 2004; SOLDI *et al.*, 2007). A Tabela 1 apresenta as composições químicas em ácidos graxos dos principais óleos vegetais industrializados.



**Tabela 1** – Composição química em ácidos graxos de diversos tipos de óleos vegetais.

Ácido Graxo		Óleo Vegetal (%)								
		Soja	Milho	Algodão	Uva	Oliva	Amendoim	Palma	Cacau	Girassol
C12:0	Láurico	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	Mirístico	0,2	0,2	0,8	0,0	0,0	0,0	0,9	0,1	0,1
C16:0	Palmítico	11,0	13,0	27,3	7,0	10,2	12,5	43,7	0,1	5,5
C16:1	Palmitoleico	0,2	0,0	0,8	0,1	0,7	0,0	0,1	0,3	0,1
C17:0	Heptadecanoico	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,1
C18:0	Estearico	4,2	2,5	2,0	3,0	2,5	2,5	4,5	44,6	4,7
C18:1	Oleico	21,8	30,5	18,3	22,1	78,1	37,9	39,8	48,1	19,5
C18:2	Linoleico	53,3	52,1	50,5	67,2	7,1	41,3	10,5	4,9	68,5
C18:3	Linolênico	7,5	1,0	0,0	0,5	0,6	0,3	0,3	0,1	0,1
C20:0	Araquídico	0,3	0,5	0,3	0,1	0,5	0,5	0,2	1,5	0,3
C20:1	Gadoleico	0,2	0,2	0,0	0,0	0,3	0,7	0,0	0,1	0,1
C22:0	Behênico	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,1	0,9
C22:1	Erúcico	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
C24:0	Lignocérico	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,2

**Fonte:** Cordeiro (2003); Alander (2007).

Residuais de óleos processados e rejeitos oriundos de processos de refino e de tratamento de efluentes estão sendo utilizados como matérias-primas para produção do biodiesel. Para essas situações, desenvolveu-se a tecnologia por via esterificação metílica em meio heterogêneo de ácidos graxos residuais (TEIXEIRA; MORALES 2011).

Estudos demonstram que o óleo produzido por microalgas é uma alternativa viável para a produção do biodiesel, sendo até dita como a única que é capaz de substituir completamente o diesel convencional. Tal fato pode ser explicado através dos vários fatores que viabilizam a aquisição desse óleo, como, por exemplo, o fato de as fontes nutritivas que são necessárias para o cultivo desses micro-organismos serem abundantes na natureza (energia solar e dióxido de carbono), tendo em vista que as microalgas realizam o processo fotossintético como meio nutricional e a elevada produtividade dos ácidos graxos sintetizados por esses seres, alcançando até uma produção 100 vezes superior quando comparada com a síntese de óleos extraídos de oleaginosas (BROWN *et al*, 1989). Outros fatores que também são favoráveis à produção de ácidos graxos de microalgas são os custos relativamente baixos para colheita e transporte, além do fato de elas conseguirem adaptação de cultivo sob condições que seriam impróprias para produção agrícola convencional, necessitando de menores gastos de água quando comparado a produções de oleoginosas convencionais (SHEEHAN *et al*, 2011).

Fechando esta subseção introdutória, a Tabela 2 apresenta as propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.

**Tabela 2** – Propriedades complementares atribuídas ao biodiesel em comparação ao óleo diesel comercial.

<b>Características</b>	<b>Propriedades Complementares</b>
Características químicas apropriadas	Livre de enxofre e compostos aromáticos, altos números de cetanos, pontos de combustão apropriados, excelente lubricidade, não tóxico e biodegradável.
Ambientalmente benéfico	Nível de toxicidade compatível ao do sal ordinário, com diluição tão rápida quanto a do açúcar (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos).
Menos poluente	Reduz sensivelmente as emissões de (a) partículas de carbono (fumaça), (b) monóxido de carbono, (c) óxido sulfúrico e (d) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.
Economicamente competitivo	Complementa todas as novas tecnologias de diesel com desempenho similar e sem a exigência da instalação de uma infraestrutura ou política de treinamento.
Reduz aquecimento global	O gás carbônico liberado é absorvido pelas plantas oleaginosas durante o crescimento, o que equilibra o balanço negativo gerado pela emissão na atmosfera.
Economicamente atraente	Permite a valorização de subprodutos de atividades agroindustriais, o aumento na arrecadação regional de ICMS, o aumento da fixação do homem no campo e de investimentos complementares em atividades rurais.
Regionalização	Pequenas e médias plantas para produção de diesel podem ser implantadas em diferentes regiões do País, aproveitando a matéria-prima disponível em cada local.

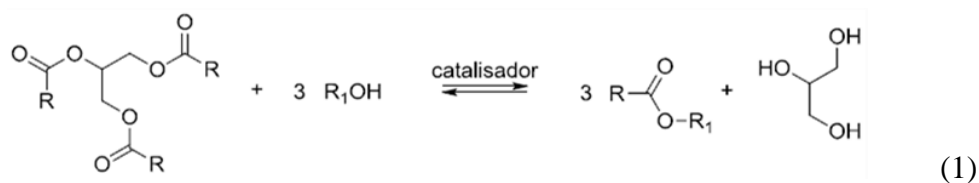
**Fonte:** Ramos (2011).

### 2.1.1 Processo de Produção do Biodiesel

Nesta subseção, serão apresentados os processos para produção do biodiesel, dando-se maior ênfase para a transesterificação, que é utilizada na unidade que forneceu o efluente para o presente estudo.

#### 2.1.1.1 Transesterificação

O método classificado como convencional para produção do biodiesel é denominado transesterificação. Nessa técnica, um mol de triacilglicerol reage com três mols de álcool de cadeia curta, sendo os mais utilizados o metanol ou o etanol, na presença de um catalisador, que pode apresentar característica homogênea, heterogênea ou enzimática (RAMOS *et al.*, 2011). A Equação 1 apresenta o processo de alcoólise de óleos vegetais, utilizando uma fonte alcoólica, na presença de um catalisador.



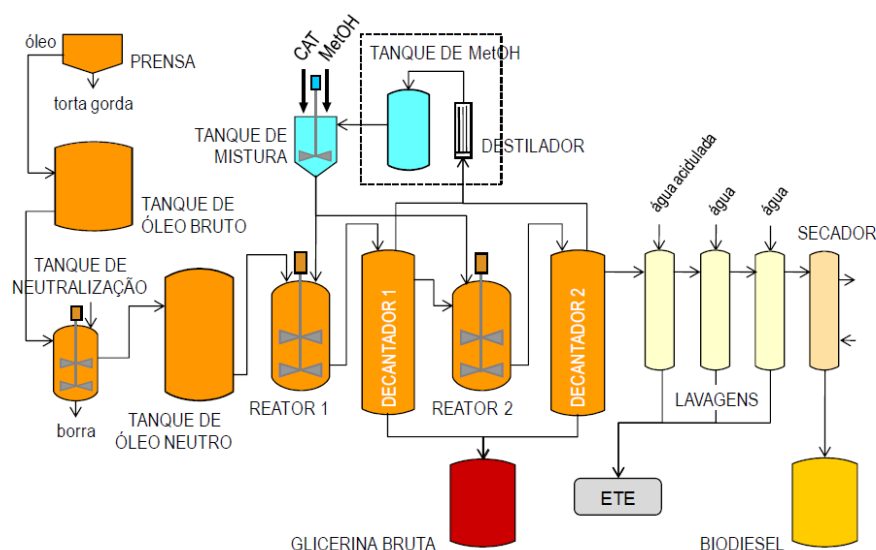
Na qual R representa um grupamento alquila e R1 o grupamento alquila do álcool utilizado.

A transesterificação metílica de óleos vegetais em meio alcalino homogêneo, com aplicação de catalisador alcóxido metálico, é classificada como o mais simples processo destinado à obtenção do biodiesel. Utilizando-se cálculos estequiométricos, é possível determinar que a razão molar de álcool e óleo no processo de transesterificação é de 3:1 (três mols de álcool para um mol de óleo), entretanto, em alguns casos, faz-se necessário utilizar excesso de fonte alcoólica em proporções relativas ao dobro ou ao quádruplo da quantidade estequiométrica, com intuito de deslocar o equilíbrio químico visando otimizar ao máximo a produção de ésteres graxos (SCHUCHARDT *et al.*, 1998).

Importante ressaltar que existem outros fatores que influenciam negativamente o processo reacional da alcoólise em meio alcalino, como a presença de ácidos graxos livres, que por sua vez reagem com o catalisador, que possui caráter básico, ocorrendo a formação de sabões. Fatores como temperatura elevada e presença de água no meio reacional diminuem o rendimento do processo. Ressalta-se que a temperatura ótima para o referido processo está entre 30 °C e 40 °C (CORDEIRO, 2003; ZAGONEL *et al*, 1999).

Outra técnica também utilizada na produção do biodiesel consiste no processo de transesterificação em meio ácido homogêneo. A principal vantagem da implantação dessa técnica está em não se ter mais o problema com relação aos ácidos graxos livres contidos nas matérias-primas oleosas, ou seja, aumenta as variedades de fontes de ácidos graxos que podem ser utilizadas sem que haja prejuízo ao processo. Já com relação à desvantagem, essa técnica necessita de condições de trabalho mais enérgicas em relação à alcoólise em meio alcalino. Vale salientar que a cinética de reação também é menos favorecida, sendo comum o uso de pelo menos 3h de reação (CANACKI *et al*, 1999).

Os principais compostos químicos utilizados como catalisadores no processo de alcoólise são os ácidos sulfúrico e sulfônico (SCHUCHARDT *et al*, 1998). A Figura 1 refere-se ao fluxograma do processo de produção de biodiesel via catálise homogênea em meio alcalino.



**Figura 1** – Fluxograma simplificado para o processo de produção de biodiesel via catálise homogênea em meio alcalino. **Fonte:** Ramos (2011).

### 2.1.1.2 Esterificação

A tecnologia de produção de biodiesel que utiliza o processo de esterificação de ácidos graxos vem se constituindo num mecanismo bastante importante uma vez que consegue gerar um biocombustível de qualidade a partir de fontes oleosas com alta acidez, ou seja, aumentando a variedade de possibilidades de matérias-primas, sendo possível até utilizar residuais oleosos para a obtenção do combustível biodegradável, o que viabiliza financeiramente ainda mais a tecnologia (SANTOS, 2016; PISARELLO; QUERINI 2007).

O processo de esterificação em meio ácido, baseado em estudos cinéticos, aplicando ácido sulfúrico como catalisador, demonstrou que, em um tempo inferior a uma hora de reação, foi possível atingir o equilíbrio reacional, obtendo o biocombustível desejado (SMITH; MARCH 2007).

No processo de esterificação de ácidos graxos com alcoóis de cadeia curta, tais como metanol e etanol, é necessária a utilização de catalisadores ácidos, como o ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico. Importante ressaltar que a reação de esterificação é reversível e o catalisador catalisa a reação direta e inversa (RAMOS, 2011). Os principais fatores que influenciam o rendimento da conversão de ácidos graxos em ésteres são a quantidade disponível de matérias-primas, a temperatura, a quantidade e o tipo de catalisador (MACHADO, 2013).

### 2.1.1.3. Processos híbridos

A tecnologia denominada de processos híbridos surgiu como uma proposta de eliminar uma das principais variáveis que limitavam o processo de produção do biodiesel, o custo processual. Com a implantação dessa técnica, é possível gerar biodiesel de alta qualidade utilizando ácidos graxos em sua forma bruta ou residuais, viabilizando financeiramente o processo (RAMOS *et al.*, 2011).

Ressalta-se que a principal causa para que seja possível a utilização de óleos com alta carga de acidez nesse processo é o fato de a reação atingir o equilíbrio em um curto período, o que é comprovado com estudos cinéticos de catálise ácida da esterificação metílica de ácidos graxos. O processo híbrido inicia-se com a esterificação ácida dos óleos brutos ou residuais,

utilizando-se como catalisador o ácido sulfúrico, seguido do processo de purificação do biodiesel gerado, havendo a remoção do catalisador ácido e da água contida no meio. Ao término do tratamento, inicia-se o processo clássico de transesterificação em meio alcalino. Vale salientar que a cinética de esterificação ácida é favorecida em relação a cinética de transesterificação básica. (CANACKI *et al.*, 1999; PISARELLO; QUERINI 2007).

O processo de hidroesterificação também visa a utilização de ácidos graxos reutilizados para a produção do biodiesel, a partir da utilização de um pré-tratamento de hidrólise dos triacilgliceróis contidos na matéria-prima oleosa. Os ácidos graxos são separados do glicerol e da água, passam pelo processo de esterificação convencional, podendo ser aplicado em meio homogêneo ou heterogêneo. As principais vantagens da tecnologia consistem na obtenção de uma fase glicérica límpida, facilitando assim o uso do glicerol em outros processos e a produção de um biodiesel com menos resíduos/contaminantes por acilgliceróis (LEÃO *et al.*, 2009; GOMES, 2009).

#### *2.1.1.4 Tecnologias de produção do biodiesel em meio heterogêneo*

Devido à necessidade de alguns pré-tratamentos durante os processos de transesterificação em meio homogêneo, quando utilizados óleos com alto grau de acidez surgiram novas alternativas, visando otimizar ainda mais a tecnologia de produção do biodiesel. Esse aperfeiçoamento de processo consiste na aplicação de catalisadores heterogêneos durante o processo de geração do biocombustível; estes auxiliam na purificação dos ésteres monoalquílicos gerados e na recuperação e purificação da glicerina produzida no processo (FARIA *et al.*, 2003).

Alguns produtos químicos, sólidos em seu estado físico, estão sendo utilizados em pesquisas científicas como catalisadores em potencial para a produção do biodiesel; entre eles, estão: zeólitas, óxidos inorgânicos, sais inorgânicos, resinas trocadoras de íons, líquidos iônicos, ácidos orgânicos, bases orgânicas. A ação desses produtos químicos como catalisadores se deve ao fato de os mesmos apresentarem sítios ácidos de Brønsted-Lowry e/ou sítios ácidos ou básicos de Lewis. Prótons, oriundos de sólidos que apresentam acidez de Brønsted-Lowry, são capazes de protonar a carbonila de ácidos graxos e/ou acilgliceróis, havendo, portanto, a formação de carbocátions. Os referidos carbocátions sofrem um ataque nucleofílico de alcoóis utilizados como

agentes de esterificação e/ou transesterificação, levando à formação de ésteres monograxos (CORDEIRO *et al*, 2011).

#### 2.1.1.5 Biocatálise

A tecnologia de geração de biodiesel denominada de biocatálise consiste na utilização de biocatalisadores em meios oleosos, onde em processos enzimáticos são utilizadas as lipases, com o objetivo de gerar a hidrólise dos ácidos graxos, liberando ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol livre. Importante ressaltar que, em alguns casos, as lipases também podem agir como catalisadores de reações de acidólise, aminólise, alcoólise, durante os processos de transesterificação, esterificação e interesterificação. Essa enzima apresenta vantagens importantes quando comparada com os catalisadores clássicos no tocante à sua especificidade, à sua regiosseletividade e enantioseletividade, que facilitam o processo de catálise de reações com um menor número de subprodutos indesejáveis, havendo portanto um baixo custo no tratamento de resíduos, além do fato de o processo necessitar de condições brandas de temperatura e pressão, com intuito de não degradar estruturalmente a lipase aplicada (FERREIRA, 2016; FACIOLI; GONÇALVES 1998).

O processo de produção em escala industrial de biodiesel é basicamente realizado por via química, entretanto a tecnologia da síntese de biocombustível por via enzimática vem apresentando interesse no segmento acadêmico, devido ao fato do processo apresentar a busca pela otimização das condições de reação, de modo a conferir características que o tornem viável e disponível para aplicações industriais. Vale salientar que a principal desvantagem da referida tecnologia ainda está na questão financeira, tendo em vista que sua síntese ainda é onerosa. Porém, quando tal fato for otimizado, o processo enzimático apresentará vantagens muito superiores em relação ao processo químico (RAMOS *et al.*, 2011).

As enzimas metabolizadas por via microbiana podem ser obtidas tanto pelo processo de fermentação submersa (FS) quanto pela técnica de fermentação no estado sólido (FES); ambas as técnicas produzem metabólitos concentrados, facilitando o seu processo de recuperação do meio de fermentação. Ressalta-se que estudos científicos apresentam novas tecnologias de obtenção



referente a uma variedade de metabólitos primários e secundários de grande interesse econômico (MITCHELL; LONSANE 2002).

## 2.2 EFLUENTE DA PRODUÇÃO DO BIODIESEL

Durante o processo de produção do biodiesel, são gerados subprodutos indesejáveis que ficam solubilizados no biocombustível. Por isso, com o objetivo de purificar o biodiesel, visando atender às normas da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP – Resolução 42), são utilizados volumes consideráveis de água durante um dos processos de extração das impurezas do biocombustível sintetizado (BRASIL, 2005). O processo de purificação do biodiesel consiste em uma série de operações unitárias constituídas pelas técnicas de lavagem, filtração e secagem. Ao término dessas etapas, é possível constatar a retirada de subprodutos, como glicerina, alcoóis (metanol ou etanol) e ácidos graxos; de resíduos de sabões que possuem altas cargas de metais alcalinos, tais como sódio ou potássio; além de outros contaminantes (NOUREDDINI, 2001; CADÓ *et al.*, 2014). Unidades de produção de biodiesel que utilizam esse método convencional de lavagem gastam em média, para cada litro de biodiesel produzido, três litros de água para a realização da lavagem (DE BONI *et al.*, 2007). Os efluentes gerados pela produção de biodiesel possuem coloração branca opaca, presença de óleos e graxas, elevado teor de sólidos, carga orgânica e baixa concentração de nitrogênio. Essas águas residuais necessitam de um tratamento específico para poderem ser lançadas ao meio ambiente (NEVES, 2011).

A Tabela 3 mostra a variabilidade da composição e dos parâmetros de caracterização de efluentes de biodiesel provenientes da técnica de transesterificação alcalina de fontes de carbono diversas, a partir de dados de diversos autores. Os estudos mostram características peculiares desses efluentes, como, por exemplo, um pH variando do neutro ao alcalino (6,8–11,2), devido à utilização de catalisadores de caráter básico durante o processo produtivo do biocombustível; uma demanda química de oxigênio (DQO) que varia de 3.700 a 590.000 mg.L<sup>-1</sup>; uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 1.500 e 300.000 mg.L<sup>-1</sup>; e um teor de óleos e graxas (TOG) variando entre 390 e 22.000 mg.L<sup>-1</sup>. Importante ressaltar que essas cargas poluentes são provenientes de residuais de matérias-primas oleosas não reagidas no processo, de caráter orgânico.

**Tabela 3** – Parâmetros de caracterização do efluente de biodiesel do processo de transesterificação alcalina.

Parâmetros	Referências							
	Suehara <i>et al.</i> (2005)	De Boni <i>et al.</i> (2007)	Chavalpari <i>et al.</i> (2009)	Jaruwat <i>et al.</i> (2010)	Rattanapan <i>et al.</i> (2011)	Ramirez <i>et al.</i> (2012)	Ramirez <i>et al.</i> (2012)	Pitakpoolsil <i>et al.</i> (2014)
Matéria-prima	Óleo residual	Óleo de cozinha usado	Óleo de cozinha usado	Óleo de cozinha usado	Óleo vegetal	Óleo de Palma	Óleo de mamona	Óleo vegetal
Catalisador	KOH	NaOH	KOH	-	-	KOH	KOH	-
Álcool	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH	-	-	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH	CH <sub>3</sub> OH
pH	11,0	10,4	8,9	9,2	8,5	11,1	11,2	9,2
Cor, uH	-	3000	-	-	-	>500	>500	-
Turbidez, uT	-	-	-	-	-	>1000	>1000	-
DQO mg.L <sup>-1</sup>	-	16564	30980	312000	150000	3681	40975	54362
DBO <sub>5</sub> mg .L <sup>-1</sup>	-	-	-	300000	60000	1600	15260	2286
COT mg.L <sup>-1</sup>	-	-	-	-	-	1700	6495	-
Óleos e Graxas mg.L <sup>-1</sup>	15100	500	6020	22000	15000	387	459	1710
Sólidos Suspensos mg.L <sup>-1</sup>	-	-	340	-	-	-	-	690
Sólidos Totais mg.L <sup>-1</sup>	2670	-	-	-	-	-	-	-
Nitrogênio mg.L <sup>-1</sup>	64,7	-	-	-	-	-	-	-

**Fonte:** Santos (2014).

## 2.3 PROCESSOS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES OLEOSOS

O tratamento da água de produção é realizado para atender, de acordo com Gomes (2009), aos requisitos de disposição do efluente, sejam estes legais, impostos pela legislação específica que protege o meio ambiente, no caso a Resolução 430/2011 do CONAMA, sejam estes operacionais, definidos pelas características do reservatório no qual se pretende injetar a água no processo de recuperação.

Para tanto, o efluente pode receber variados tratamentos, mas que se resumem basicamente a quatro tipos: físicos, físico-químicos (mais convencionais), eletroquímicos ou biológicos, ou ainda uma combinação entre eles (IGUNNU; CHEN, 2012). Em geral, o tratamento constitui um conjunto dessas operações, que são estabelecidas, principalmente, de acordo com a concentração inicial de óleo e a concentração final desejada.

As técnicas convencionais de separação de fases, provenientes de processos físicos, não removem os compostos orgânicos solubilizados na fase aquosa. Por isso, variados tratamentos biológicos e oxidações químicas vêm sendo usados para tratar a água de produção da indústria desse segmento (SHOKROLLAHZADEH *et al.*, 2012).

Os efluentes que possuem alta concentração de gorduras podem ser tratados com as lipases de triacilglicerol (hidrolases, EC3.1.1.3), produto este que é responsável por hidrolisar as gorduras contidas no meio em glicerol e ácidos graxos livres. Essa ação faz com que melhore a biodegradabilidade do efluente, tornando mais fácil a sua degradação por inteiro (ROCHA, 2010).

## 2.4 PROCESSOS DE TRATAMENTO DE EFLUENTE DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Os principais tipos de tratamento aplicados em efluentes provenientes de biodiesel, bem como resultados de eficiência de remoção de impurezas, tempo de duração processual e possíveis subprodutos gerados pela implantação da respectiva tecnologia, são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Tipos de tratamento do efluente de biodiesel, porcentagens de remoção, tempo usado e produtos gerados.

<b>Tipo de Tratamento</b>	<b>% Remoção</b>	<b>Tempo de Duração</b>	<b>Produtos Gerados</b>	<b>Referência</b>
Eletrocoagulação	DQO: 5,7	25 min	NI*	Srirangsan <i>et al.</i> (2009)
	Glicerina: 3,5			
	Metanol: 12			
	Sól. suspensos: 100			
	TOG: 100			
Eletrocoagulação	DQO: 55,01	23 min	NI*	Chavalparit <i>et al.</i> (2009)
	Sól. Suspensos: 96,75			
	TOG: 100			
Oxidação eletroquímica	DBO:90	7 h	NI*	Pattaraluk <i>et al.</i> (2010)
	DQO: 100			
	TOG: 100			
Biológico ( <i>Rhodotoruda mucilaginosa</i> )	TOG: 98	66 h	NI*	Suehara <i>et al.</i> (2005)
Biológico (Inóculo UASB – Abatedouro de aves)	Matéria orgânica: 85	8 h	NI*	Selma <i>et al.</i> (2010)
	DQO: 66,93			
Físico-químico (Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> )	DQO: 69	NI*	NI*	Goldani <i>et al.</i> (2010)
	Cor, turbidez, hidrocarboneto e TOG: 100			
Eletrocoagulação + codigestão anaeróbia	DQO: 81	18–45 h	Metano	Siles <i>et al.</i> (2010)
Biológico (inóculo: águas residuais domésticas)	DQO:90	700 h	Eletricidade: 2110 + ou - 68 mW.m <sup>2</sup> de cátodo	Feng <i>et al.</i> (2011)

\*NI: Não identificado. **Fonte:** Palomino-Romero (2011).

### 2.4.1 Tratamentos Eletroquímicos

Os processos denominados como eletroquímicos baseiam-se na aplicação direta de corrente elétrica no efluente contaminado com residuais iônicos, com intuito de provocar a eletrocoagulação dessas impurezas. Para que ocorra a descarga elétrica de forma efetiva e homogênea, faz-se necessária a utilização de ânodos e cátodos metálicos, de área média de 50 cm<sup>2</sup>, sendo os mais utilizados os de Fe-Fe, Fe-C, Al-Al, Al-C e C-C (SRIRANGSAN *et al.*, 2009).

Estudos realizados com efluentes de biodiesel que utilizaram como matéria-prima o óleo de fritura e o óleo de palma cru revelaram que a técnica de eletrocoagulação utilizando uma combinação de um ânodo de alumínio e um cátodo de grafite (Al-C), aplicando uma densidade de corrente de 8,32 mA cm<sup>-2</sup>, um tempo de retenção de 25 min, em pH inicial do efluente de 6, foi eficiente na remoção da demanda química de oxigênio (DQO), dos sólidos suspensos (SS) e do teor de óleos e graxas (TOG) de 55,7, 97,5 e 97,8%, respectivamente. Enquanto as eficiências de remoção relacionadas aos teores de glicerina e metanol foram inferiores e correspondentes a 3,5 e 16,9%, respectivamente. Portanto, o estudo constatou que o tratamento por eletrocoagulação pode ser eficiente se usado como tratamento primário para o efluente da produção de biodiesel, sendo, necessário um tratamento secundário para remoção da glicerina e do metanol ainda presentes no meio (SRIRANGSAN *et al.*, 2009).

Outra alternativa pesquisada nesse âmbito de tratamento de efluentes de biodiesel por via eletroquímica trata-se do tratamento oxidativo agregado ao eletroquímico a partir da utilização de eletrodos constituídos por duas grades de Ti/RuO<sub>2</sub>. No experimento realizado por Pattaraluk (2010), foram usados eletrodos compostos por duas grades de Ti/RuO<sub>2</sub>, com uma área de superfície de 816,5 cm<sup>2</sup> em ambas grades. Os resultados demonstraram que, quando aplicada uma densidade de corrente de 5,51 mA cm<sup>-2</sup>, após 7 h de eletrólise, em um pH do efluente acidificado a 2,5, foi possível obter valores correspondentes a 67 e 84% de DBO e DQO, respectivamente, enquanto a remoção completa do TOG foi alcançada após 5 h (PATTARALUK *et al.*, 2010).

### 2.4.2 Tratamentos Físico-químicos

Os processos físico-químicos para tratamento de água e efluentes são empregados com a finalidade de remover partículas coloidais e sólidos em suspensão (EL-GOHARY *et al.*, 2010). O tratamento também visa remover da água substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas que podem ser prejudiciais à saúde humana. Os processos físico-químicos são comumente utilizados para tratamento de água de abastecimento, todavia tem sido muito estudada a utilização dessa tecnologia para tratamento de efluentes domésticos e industriais. Os principais processos físico-químicos de tratamento de água e efluentes são coagulação, floculação, decantação/flotação e filtração.

Esses tratamentos são muito utilizados como pós-tratamento de efluentes para a reutilização de água tratada em processos industriais. Uma boa operação e controle das técnicas de coagulação, floculação e decantação podem garantir boa eficiência de remoção da carga orgânica de diversos efluentes (JORDÃO; PESSÔA, 2016).

O processo de coagulação de águas e efluentes, em geral, consiste na aplicação de agentes químicos que fazem com que ocorram reações de desestabilização, fazendo com que as estruturas coloidais que constituem o meio formem agregados maiores devido à floculação pericínética (METCALF; EDDY, 2015).

Essa desestabilização dos particulados contidos no meio aquoso a ser tratado gera cargas elétricas na interface do meio com a água devido à adsorção dos íons negativos contidos na estrutura molecular da água, havendo com isso uma repulsão entre a água e os coloides. Devido a tal fato, surge uma barreira que tenta evitar a agregação dos particulados, dificultando a sedimentação dos coágulos. Portanto, é de fundamental importância a eliminação dessa barreira para que ocorra a aglomeração das partículas (NEVES, 2011).

Existem alguns fatores que interferem no processo de coagulação, entre eles estão a dosagem de coagulante, o pH, a temperatura, a presença de íons na solução, a concentração das partículas coloidais, a cor e o gradiente de velocidade utilizado na agitação do processo. Entre os agentes coagulantes mais conhecidos comercialmente, encontram-se o sulfato de alumínio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ), o sulfato férrico ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), o sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), o cloreto férrico

(FeCl<sub>3</sub>) e o policloreto de alumínio (Al<sub>n</sub>(OH)<sub>m</sub> Cl<sub>(3n-m)</sub>), em que n e m são as variações de razões estequiométricas que podem ocorrer (EL-GOHARY *et al.*, 2010).

De acordo com Neves (2011), o processo de floculação consiste num fenômeno físico, que é dependente de fatores como a temperatura da água, a intensidade e o período de agitação introduzido no meio a ser tratado. Já fatores como o gradiente de velocidade e o tempo de detenção são fundamentais para uma eficiente floculação, tendo em vista que são parâmetros que influenciam diretamente no tamanho dos flocos em formação e consequentemente na sua densidade.

A técnica de decantação consiste no processo de sedimentação dos flocos pesados, ou seja, mais densos do que o líquido em que se encontram inseridos, oriundos da etapa de coagulação, devido à ação da força da gravidade. Esse processo propicia a clarificação da água, separando o meio original nas fases líquida e sólida. Importante ressaltar que se o tamanho dos flocos for menor e estes estiverem espalhados, pode ter ocorrido a ruptura dos mesmos, sendo portanto necessária a utilização de auxiliares coagulantes (METCALF; EDDY, 2015).

### 2.4.3 Tratamentos Combinados

A técnica de tratamentos combinados consiste em utilizar mais de uma tecnologia de forma conjugada, com o intuito de remover todas as impurezas contidas no efluente que necessita ser tratado. Estudos como o de Siles (2010) empregaram a técnica de eletrocoagulação como pré-tratamento e a codigestão anaeróbia para o tratamento de efluente derivado da produção do biodiesel que utilizou óleo de fritura como matéria-prima. O efluente era rico em biodiesel, glicerol, ácidos graxos livres e metanol. Foi necessário acidificá-lo previamente com ácido sulfúrico e depois centrifugá-lo para poder separar a fase oleosa da fase aquosa. O pH dessa fase aquosa foi neutralizado e, logo em seguida, submetido à eletrocoagulação, quando foram introduzidos oito eletrodos de alumínio com área superficial total de 80,5 cm<sup>2</sup>, através dos quais foi aplicada uma corrente de 1,5 A (12 V) por 30 min. A diminuição da DQO total após pré-tratamento por acidificação-centrifugação e eletrocoagulação foi de 45%. Ao efluente pré-tratado, foi adicionado glicerol, e o seu pH foi ajustado para valores próximos da neutralidade, para, em seguida, ser introduzido no tratamento de codigestão anaeróbia. Ao término do processo, foi

possível constatar que a maior parte da DQO removida foi utilizada na produção de metano e o metabolismo microbiano foi direcionado para a produção do referido gás. Ainda foi possível verificar o fator biodegradabilidade do efluente, calculado pelo ajuste da curva da quantidade de substrato removido em função da concentração de substrato inicial para cada experimento. Esse resultado gerou uma reta, cuja inclinação demonstrou a porcentagem de biodegradabilidade do efluente, que ficou próxima de 100%, havendo nesse ponto uma concentração de metano de 310 mL g<sup>-1</sup> de DQO removida a 1atm e 25 °C (SILES *et al.*, 2010).

#### 2.4.4 Tratamentos Biológicos

O termo biotransformação refere-se à tecnologia que utiliza biocatalisadores com objetivo de atuar diretamente em modificações específicas ou interconversões da estrutura química de materiais indesejáveis contidos no meio reacional (LEON *et al.*, 1998). O mecanismo age com grande eficiência em meios que contêm cargas oleosas, onde o biocatalisador atuará degradando essas impurezas. São classificados como biocatalisadores micro-organismos vivos íntegros ou outros materiais biológicos, como RNA, anticorpos ou enzimas isoladas ou contidas em células (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Dentre estes, as enzimas purificadas, extraídas dos micro-organismos, são as mais utilizadas, pois, além de terem elevada eficiência catalítica e serem estritamente seletivas, ainda são os biocatalisadores que menos geram reações secundárias indesejáveis (WISEMAN, 1995).

Por apresentarem vantagens significativas em relação a tecnologias concorrentes, a aplicação dessas enzimas em processos industriais tem crescido consideravelmente. Dentre as principais enzimas industriais, a que se destaca comercialmente é a lipase, devido principalmente ao fato de possuir um elevado potencial biotecnológico, tendo em vista sua alta estabilidade em solventes orgânicos; não necessitar da presença de agentes cofatores; ter especificidade pelo substrato; além de ter enantiosseletividade (JAEGER; REETZ 1998; TOMBINI, 2015).

A principal área de aplicação das enzimas no âmbito industrial está nas indústrias de detergentes, entretanto novas aplicações estão se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como na indústria farmacêutica, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais. As lipases conquistaram uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais (SHARMA *et al.*, 2001).



#### 2.4.4.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol-acil hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como enzimas hidrossolúveis que possuem a característica de catalisar reações de hidrólise de triacilglicerol, degradando a molécula orgânica original em estruturas menores. As lipases também podem ser utilizadas como catalisadores, em processos industriais de síntese, tais como esterificação e interesterificação, sejam elas transesterificação, alcoólise ou acidólise (REIS *et al.*, 2009; SAXENA *et al.*, 2003). Sua ação catalisadora pode ser determinada por diferentes formas, tendo em vista que as lipases podem ser encontradas no interior de células (lipase intracelular), em formulados de lipases em soluções aquosas (lipase livre) e sob formas encapsuladas ou adsorvidas em uma matriz (lipase imobilizada) (STERGIOU *et al.*, 2013).

As lipases têm graus de seletividade em relação aos substratos onde elas atuam. Essas enzimas podem catalisar reações de diversas moléculas, entretanto a sua eficiência catalítica pode variar de acordo com a estrutura molecular dos componentes utilizados no processo (REIS *et al.*, 2009). Elas possuem características específicas referentes à sua máxima atividade e estabilidade quando estão atuando em meios reacionais com pH ótimo, variando entre 6,0 e 8,0, e a temperatura entre 30°C e 40°C. As lipases, em sua maioria, são glicoproteínas ácidas que possuem massa molecular variando de 20 a 60 kDa. Possuem ponto isoelétrico entre o pH 4 e 5. (VAZ; CHOUPINA 2012).

Os micro-organismos produtores de lipases podem ser encontrados em diferentes ambientes, sejam eles resíduos agroindustriais com carga oleosa, solos contaminados com óleos, sementes ou alimentos deteriorados. Portanto, tal fato oferece uma variedade de lipases com novas propriedades. Como a lipase está entre as enzimas mais utilizadas com aplicações biotecnológicas, a busca é sempre por micro-organismos a partir de fontes naturais (SALIHU *et al.*, 2012).

#### 2.4.4.2 Especificidade das lipases

Quando se deseja introduzir lipase em um processo produtivo no âmbito industrial, faz-se necessário definir qual a especificidade que se desejará extrair da enzima, tendo em vista que elas são classificadas em três grupos de graus de específicos, de acordo com suas características. As

lipases classificadas como não específicas são produzidas pelos micro-organismos *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas sp.* Esse tipo de lipase possui a característica de quebrar as moléculas de acilglicerol, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis. Já as lipases identificadas como lipases 1,3 específicas, sintetizadas pelos micro-organismos *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*, possuem essa denominação por liberarem ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por essa razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regioseletivas. Por fim, a lipase de ácido graxo específica, sintetizada pelo fungo *Geotrichum candidum*, possui como ação específica hidrolisar ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeias longas insaturadas com duplas ligações, em *cis* no nono carbono da molécula (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER 1998).

Outras características importantes das lipases que devem ser levadas em consideração são referentes à simplicidade de manipulação e facilidade de aplicação no processo; à não necessidade de se ter uma temperatura específica para armazenar a biomassa enzimática; ao fato de conseguirem obter, a partir de sua aplicação, eficiente resultado de degradação e remoção de resíduos, estando eles em alta ou em baixa concentração no meio a ser tratado; além de conseguirem atuar em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade. Ao se ter o conhecimento das especificidades das lipases, é possível projetar sua aplicação em diversas áreas e possibilidades, entre elas no âmbito de tratamento de efluentes industriais gerados nos segmentos alimentício, de combustíveis (óleos), têxtil (corantes), de papel e derivados de celulose (estruturas poliméricas), entre outros (MENDES *et al.*, 2005).

## 2.5 PRODUÇÃO DE LIPASE COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Roveda *et al.* (2010) estudaram a possibilidade da utilização do próprio efluente industrial oleoso, enriquecido com macro e micronutrientes inorgânicos como matéria-prima nutritiva para a produção da lipase. O micro-organismo usado durante a produção da enzima também foi retirado e isolado do específico meio. Em seus resultados, constataram que os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram as maiores atividades enzimáticas, com valores de 2,042 e 2,250 U/g, respectivamente. A maior produção de lipases

ocorreu com a utilização do efluente da saída do equalizador, devido à sua elevada carga de resíduos oleosos.

Ul-Haq, Idress e Rajoka (2002) analisaram a produção de lipase por *Rhizopus sp* em diferentes tortas (amêndoa, coco, mostarda e soja), além de palha de arroz e farelo de trigo. A maior atividade enzimática obtida foi 48 U/g quando se utilizou a torta de amêndoa. Rodriguez *et al.* (2006) adotaram uma cepa de *R. homothallicus* para produzir lipase em bagaço de cana umedecido com meio líquido, constituído por ureia, óleo de oliva e microelementos ( $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  e EDTA). A máxima atividade (826 U/g) foi obtida em somente 12 h de incubação.

Sun e Xu (2008) investigaram a produção de lipase de *R. chinensis* via fermentação submersa utilizando farinha e farelo de trigo (3:2 m.m<sup>-1</sup>). A máxima atividade enzimática obtida foi de (24,5 U/kg), após 72 h de cultivo. O meio produtivo apresentava umidade inicial de 70%, pH inicial de 6,5, peptona (2% m.m<sup>-1</sup>) e óleo de oliva (2% v.m<sup>-1</sup>) como indutor. Os autores compararam as lipases extraídas da membrana celular desse mesmo micro-organismo cultivado via fermentação em estado sólido e via fermentação submersa. A lipase de cada um dos processos fermentativos foi purificada e ambas apresentaram atividade máxima a 40 °C e pH 8,0. As lipases apresentaram diferença na massa molecular aparente (62 e 40 kDa, respectivamente), sendo que a enzima obtida via fermentação submersa foi mais termoestável e mais tolerante ao pH (SUN; XU, 2008).

Cordova *et al.* (1998) avaliaram a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis* via fermentação submersa, utilizando como substratos torta de azeitona e bagaço de cana-de-açúcar. As maiores atividades (79,6 U/g e 20,24 U/g, respectivamente) foram obtidas com uma mistura de 50% de ambos substratos.

## 2.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA DE PRODUÇÃO DA LIPASE

Muruci *et al.* (2012) realizaram em seus experimentos a cinética da produção de lipase por *A. niger* em colunas aeradas utilizando planejamento de experimentos, com intuito de conhecer o perfil de produção da lipase e identificar o tempo ótimo da produção da enzima nas condições estudadas. Foram retiradas das colunas amostras do meio fermentado nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Os meios foram extraídos com solução-tampão, filtrados e microfiltrados até a obtenção

do extrato enzimático bruto e posteriormente foram avaliados quanto às atividades lipásica (U/gms) e proteásica (U.mL<sup>-1</sup>), respectivamente. O planejamento experimental de Plackett e Burman foi utilizado com o objetivo de selecionar as variáveis que influenciam de forma significativa a produção de lipases. Foram estudadas quatro variáveis de processo: concentração de inóculo, concentração de fontes lipídicas, volumes de solução de sulfato de amônio (VSSA) e aeração. Os resultados obtidos pela pesquisa constataram que a melhor condição para a produção de lipase de *Aspergillus niger* em colunas aeradas utilizando planejamento fatorial completo foi observada com 1,0% de borra de milho, 1 vvm de aeração, 106 esporos/g de meio e 60 mL de solução de sulfato de amônio; nessas condições obteve-se atividade lipásica em torno de 216 U/gms.

Vargas (2004) realizou, em seus experimentos, o estudo cinético de produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* por fermentação sólida, utilizando torta de soja como substrato, com o propósito de determinar a fase máxima de produção de lipase e protease, além de avaliar a ação dos insumos nutritivos utilizados no meio processual. Foram retiradas das colunas amostras do meio fermentado nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O estudo determinou que a temperatura e a umidade do meio foram os fatores preponderantes para a produção da enzima. Observou-se também que a maior produção de lipase ocorreu em 27,5 °C, em uma umidade de 55%, obtendo-se uma lipase com concentração de 30 U/g.

## 2.7 TRATAMENTO DE EFLUENTES OLEOSOS COM LIPASE

Valente *et al.* (2010) estudaram a pré-hidrólise da gordura de efluente da indústria de pescado pela lipase do fungo *Penicillium simplicissimum* nas concentrações de 0,2, 0,5 e 1,0% m/v em processo descontínuo. A diferença na produção de ácidos graxos livres produzidos nos experimentos não foi significativa, apesar de ter aumentado com o teor de *Penicillium simplicissimum* na hidrólise, devido, possivelmente, ao fato de haver produção e consumo simultâneos desses compostos no meio reacional.

Segundo os estudos de Pereira, Castro e Furigo (2003), as porcentagens de hidrólise lipolítica mais elevadas nos efluentes de indústrias avícolas foram obtidas em pH 7. O desempenho insatisfatório na atividade enzimática observado em pHs maiores que 8,34 pode ser atribuído à rápida elevação do pH do meio reacional a valores maiores que 9,0, afastando-se

assim do pH ótimo de atuação da lipase, resultando na redução da atividade hidrolítica da enzima. Em pH menor que 6,6, houve, possivelmente, também inibição da lipase, haja vista que estas atuam, preferencialmente, em pH alcalino ou próximo do neutro. Essas alterações podem estar relacionadas com possíveis mudanças conformacionais da enzima ou alterações no macroambiente, ou seja, na concentração do substrato, no produto, nos íons hidrogênio e íons hidroxilas do meio reacional (SAID; PIETRO, 2004; FERNÁNDEZ, 2007).

Carvalho (2014) analisou a atuação das lipases presentes no extrato enzimático da lipase de *Burkholderia cepacia*. Os melhores resultados foram encontrados a 37 °C e pH 8,0. As melhores condições para a hidrólise do efluente industrial estudado se deram com a utilização do processo descontínuo, em pH 7,5, concentração de enzima de 0,12 g.mL<sup>-1</sup>, 7,5% de goma arábica a 7% e em tempo de reação de 3 h, o que proporcionou maior hidrólise dos triacilglicerídeos.

## 2.8 UTILIZAÇÃO DE GOMA ARÁBICA NA DETERMINAÇÃO DE EFICIÊNCIA LIPOLÍTICA DA LIPASE

A Goma arábica, também conhecida como goma acácia é um polissacarídeo obtido pelo processo de desidratação da seiva dos troncos e dos ramos das espécies da Acácia senegal e Acácia seyal (GABAS, 2003).

Agentes emulsificantes, como a goma arábica, têm sido sistematicamente empregados em dosagens de atividade lipolítica quando se utilizam triacilglicerídeos de cadeia longa, como substratos, não sendo considerados interferentes na hidrólise enzimática de lipídeos (MENDES; CASTRO *et al*, 2004).

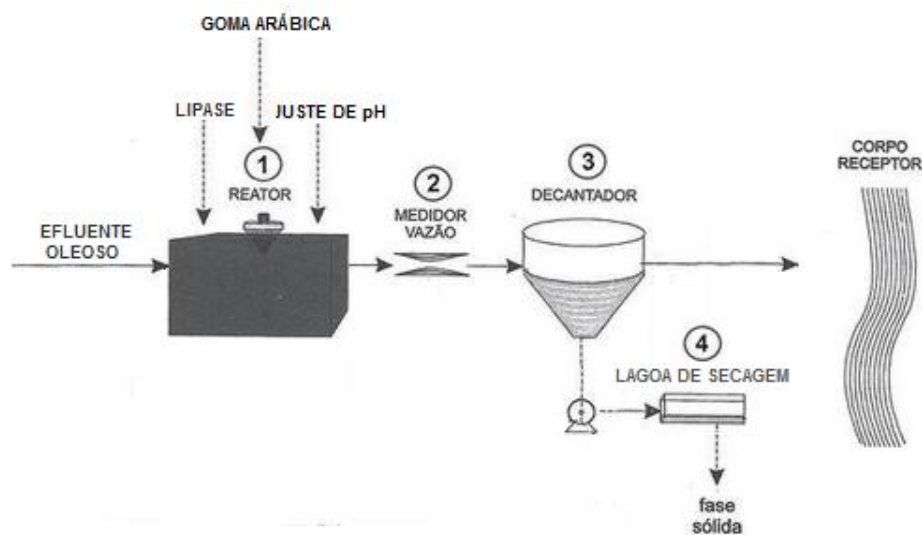
Pereira *et al.* (2003), estudando a hidrólise de lipídeos de efluentes gerados em frigoríficos avícolas, pela lipase de *Candida rugosa*, verificaram que a hidrólise máxima foi obtida quando se utilizaram 3% de agente emulsificante no meio reacional. Tiss *et al.* (2002) observaram o efeito da goma arábica sobre a hidrólise de ésteres trioctanoicos, com a utilização de lipases de fontes microbiana e animal. No citado trabalho, o uso da goma arábica a 7% como agente emulsificante ativou a reação de hidrólise, uma vez que se obteve melhor resposta da atividade hidrolítica quando a goma arábica foi utilizada no meio reacional.

Carvalho *et al.* (2014) utilizaram goma arábica nos experimentos destinados a avaliar o processo de pré-tratamento enzimático de efluentes oleosos provenientes da indústria de batatas

fritas, a partir de lipase produzida pela *Burkholderia cepacia*. Através dos resultados obtidos pelo planejamento fatorial realizado na pesquisa, os autores determinaram que a utilização de goma arábica foi estatisticamente significativa para o aumento da eficiência da atividade hidrolítica da lipase.

## 2.9 FLUXOGRAMA GERAL DO TRATAMENTO DO EFLUENTE OLEOSO DE BIODIESEL

O fluxograma da tecnologia de tratamento do efluente oleoso de biodiesel proveniente do processo de transesterificação alcalina é mostrado na Figura 2. Ressalta-se que este fluxograma é uma adaptação de Von Sperling (2005), modificado de acordo com os processos utilizados pela vigente pesquisa. Os principais passos do processo são os seguintes: alcalinização do efluente visando ajustar o pH do mesmo, com intuito de otimizar o processo subsequente, que consiste na lipólise dos resíduos oleosos contidos no efluente, a partir da aplicação da lipase e da solução de goma arábica, que, por apresentar ação emulsificante, possui a função de aumentar a interação enzima-óleos e graxas presentes no efluente, elevando a eficiência da enzima aplicada. Após a decantação das impurezas contidas na água residual, o lodo decantado será captado do decantador e colocado nas lagoas de secagem, e o líquido sobrenadante totalmente tratado e de acordo com as exigências dos órgãos fiscalizadores será lançado nos corpos receptores.



**Figura 2** – Fluxograma do tratamento de efluente de biodiesel com produtos biotecnológicos.

**Fonte:** Adaptado de Von Sperling (2005)

## 2.10 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Durante o desenvolvimento de um projeto sabe-se da importância de se estudar simultaneamente o efeito de vários fatores sobre determinadas propriedades, a fim de otimizar um determinado processo. Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010), usando os planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis realizando um número mínimo de experimentos. Portanto, o planejamento do experimento é uma das fases mais importantes do processo de investigação científica, pois, quando é cuidadosamente executado, é capaz de criar uma estrutura bem definida para o experimento.

De acordo com Montgomery (2004), a utilização de um planejamento experimental é um ensaio ou série de ensaios, em que são realizadas mudanças conhecidas nas denominadas variáveis de entrada de um processo, visando analisar e identificar mudanças que estejam correlacionadas com a resposta de saída. Para ter um bom planejamento, é importante conhecer exatamente o objetivo do estudo e determinar as variáveis respostas. Ainda é de fundamental importância ter o conhecimento suficiente sobre o sistema em estudo, para que se possa determinar corretamente as variáveis de entrada, juntamente com os seus respectivos níveis que devem ser escolhidos.

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, pois permitem avaliar, simultaneamente, o efeito de variáveis que podem influenciar na resposta, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005).

Após a realização de todos os experimentos do planejamento, faz-se a avaliação estatística dos dados obtidos. Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010), o método mais utilizado para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo é a Análise de Variância (ANOVA). O exame dos resíduos também é de fundamental importância para avaliar a qualidade do ajuste de qualquer modelo. Considerando que os resíduos representam a diferença entre o valor observado e sua estimativa de acordo com o modelo, espera-se que um modelo bem representado deixe pequenos resíduos. Cabe ao pesquisador, porém, decidir sobre o nível de precisão que ele considera aceitável ao seu modelo. Finalmente, a metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfície de resposta, é uma ferramenta fundamentada na teoria

estatística e dentro da faixa estudada, fornece informações seguras sobre o processo e minimiza o empirismo envolvido em técnicas de tentativa e erro.

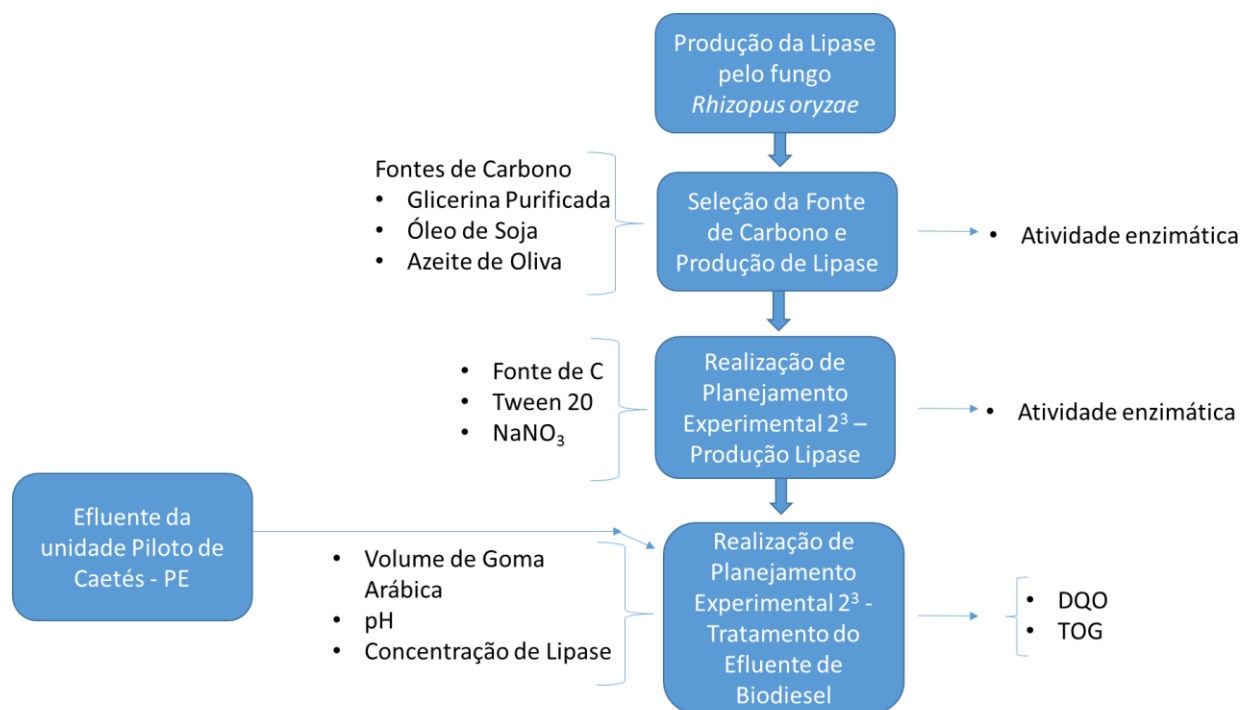
A superfície de resposta é uma figura que representa graficamente a variação da variável resposta em função de dois ou mais fatores do processo. Após a modelagem, ou seja, o ajuste dos modelos (lineares, quadráticos, etc.) aos resultados obtidos, constroem-se as superfícies de resposta de interesse e, então, desloca-se ao longo dela, a fim de encontrar a região de máxima ou mínima inclinação, dependendo do interesse do pesquisador, para encontrar a melhor combinação dos níveis de fatores para o resultado desejado (FERNANDES JR., 2002).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O propósito deste capítulo consiste em detalhar os procedimentos experimentais que foram utilizados para alcançar os objetivos propostos pela presente dissertação, descrevendo os materiais e equipamentos que foram usados, bem como os métodos que foram empregados.

A metodologia foi desenvolvida basicamente em quatro etapas, representadas no fluxograma da Figura 3. A primeira abrangeu toda a caracterização do efluente, determinando alguns parâmetros físico-químicos do efluente bruto. Nessa etapa também ocorreu o processo de purificação da glicerina residual, o qual consiste no processo de acidificação da glicerina bruta com ácido fosfórico P.A., havendo posteriormente a sua neutralização com solução de NaOH a 1 M; em seguida o meio foi filtrado com papel-filtro e destilado a partir da utilização de um sistema de destilação simples de bancada. Todos os experimentos dessa etapa foram desenvolvidos no laboratório do GPTA–UFPE.



**Figura 3** – Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo.

A segunda etapa consistiu na realização da manutenção da cepa fúngica e do estudo visando determinar qual fonte oleosa, dentre as estudadas, é a mais eficiente atuando como fonte de carbono na produção da lipase, por via microbiológica. Vale salientar que, no estudo de manutenção das cepas, foram usados óleo de soja, azeite de oliva e glicerina P.A.; em cada meio nutritivo foi usada uma dessas fontes de carbono. Já no estudo destinado a definir a fonte de carbono oleosa a ser utilizada na produção da lipase, foram usados óleo de soja, azeite de oliva e glicerina residual purificada; em cada meio nutritivo foi usada uma dessas fontes de carbono. A referida pesquisa utilizou a tecnologia de fermentação submersa, adotando o fungo *Rhizopus oryzae* como agente fermentador para a produção da enzima.

Na terceira etapa, foram realizados ensaios visando otimizar a produção da lipase, com o uso da técnica estatística do planejamento experimental. Dessa forma, puderam-se determinar os melhores meios de cultivo e suas referidas concentrações, visando atingir o máximo da atividade enzimática da lipase bruta (variável resposta do planejamento).

A quarta etapa consistiu no tratamento do efluente oleoso a partir da aplicação da lipase na etapa de tratamento do efluente. Essa etapa foi constituída de outro planejamento experimental, que teve duas respostas: a demanda química de oxigênio (DQO) e o teor de óleos e graxas (TOG), que foram analisados independentemente. Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de energia da biomassa do Departamento de Energia Nuclear (DEN) da UFPE, no laboratório do Grupo de Processos e Tecnologias Ambientais (GPTA) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da UFPE e no setor de inovação da empresa Claeff Engenharia e Produtos Químicos (Camaragibe – Recife – PE). As análises de determinação de teor de óleos e graxas das amostras experimentais foram realizadas no laboratório Merieux NutriSciences – Bioagri Ambiental.

### 3.1 O EFLUENTE

O efluente usado foi proveniente da planta piloto de produção de biodiesel do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), localizado no município de Caetés, agreste pernambucano, Brasil.

O efluente foi coletado na saída do tanque equalizador, com capacidade de 5 m<sup>3</sup>, que recebe todo o efluente gerado da produção do biodiesel, que utiliza óleo de semente de algodão

residual como matéria-prima oleosa e aplica a técnica de transesterificação homogênea, adotando o metóxido de potássio como catalisador e o álcool metílico como fonte alcoólica.

As amostras foram armazenadas em recipientes plásticos com capacidade para 5 litros e foram trazidas a Recife em temperatura ambiente, onde foram mantidas sob refrigeração a 5 °C. Os parâmetros analisados foram: demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos totais (ST), teor de óleos e graxas (TOG), pH, temperatura, sólidos totais dissolvidos (STD), condutividade e turbidez. Todos os métodos utilizados para a determinação desses parâmetros foram realizados segundo o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005). A Tabela 5 apresenta os parâmetros que foram utilizados para caracterização desse efluente oleoso, assim como os valores máximos permitidos para descarte do efluente em corpo hídrico, especificados pela Resolução CONAMA 430/2011

**Tabela 5** – Metodologias para caracterização de efluentes oleosos de acordo com as metodologias do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2015) e limites de descarte da Resolução CONAMA 430/11.

Parâmetros	Unidade	Método	Número do Método	CONAMA 430 Art. 16 VPM
pH (a 25 °C)	-	Potenciométrico	4500-H <sup>+</sup>	5,0 – 9,0
DBO	mg.L <sup>-1</sup>	Colorimétrico por refluxo fechado	5210-B	NE
DQO	mg.L <sup>-1</sup>	Colorimétrico por refluxo fechado	5220-D	NE
Temperatura	°C	Termômetro	-	NE
Óleos e graxas Vegetais	mg.L <sup>-1</sup>	Extração- Soxhlet	5520-D	20,0
Sólidos dissolvidos totais	mg.L <sup>-1</sup>	Gravimétrico	2540-E	1,0
Sólidos totais	mg.L <sup>-1</sup>	Gravimétrico	2540-D	NE
Turbidez	NTU	Nefelométrico/Turbidímetro	2130 B	NE
Condutividade	µS.cm <sup>-1</sup>	Eletrométrico	2510 B	NE

NE – Não especificado.

### 3.2 A GLICERINA RESIDUAL

A glicerina residual usada no estudo foi proveniente da planta piloto de produção de biodiesel do CETENE, a qual utiliza  $\text{KOCH}_3$ , como catalisador. A amostra apresentou uma coloração enegrecida, elevada densidade e presença de sólidos escuros em suspensão.

A amostra da glicerina residual foi coletada pela parte inferior do tanque decantador, que recebe todo o meio reacional da produção de biodiesel, onde, por gravidade, ocorre a separação entre o biodiesel e a glicerina residual gerada, devido às diferenças de densidades.

### 3.3 PURIFICAÇÃO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL

O processo utilizado para remover as impurezas contidas na glicerina residual que foi utilizada como fonte de carbono na produção da lipase baseou-se nos procedimentos expostos nos trabalhos de Bailey *et al.* (2005) e Pitt (2010).

O tratamento iniciou-se com aplicação de ácido fosfórico P.A. na glicerina bruta, numa proporção de 0,5 g:100 g da glicerina residual, com o propósito de ocorrer a hidrólise ácida de matérias-primas residuais contidas no meio, havendo a separação das impurezas oleosas que estavam emulsionadas no meio, formando fases, tornando-se possível a sua remoção. Após a retirada dos ácidos graxos e do residual de catalisador a partir da implantação da técnica abordada, a glicerina foi neutralizada com solução de hidróxido de sódio  $1 \text{ Mol.L}^{-1}$ ; em seguida foi diluída com água destilada numa proporção de 10 g:100 g da glicerina em tratamento, sendo posteriormente filtrada com papel-filtro de porosidade de 3 micras e destilada em aparelho de destilação simples.

### 3.4 A ENZIMA LIPASE

A lipase foi produzida com a finalidade de ser aplicada no efluente oleoso produzido pelo processo de produção do biodiesel, com o intuito de hidrolisar as cadeias de triacilgliceróis, formando ácidos graxos de pequena cadeia carbônica e moléculas de glicerol, estruturas estas fáceis de serem tratadas.

### 3.4.1 Micro-organismo

O micro-organismo escolhido para a produção da lipase foi o fungo filamentoso *Rizhorus oryzae* URM 4692, obtido do Banco de Germoplasmas de Fungos de Interesse Industrial da FungiNE Biotecnologia Ltda. e que teve como origem a Micoteca URM do Departamento de Micologia da UFPE. Importante ressaltar que essa cepa já foi utilizada para produções de lipase em testes laboratoriais da referida empresa, ou seja, a espécie está adaptada e condicionada à produção da enzima.

### 3.4.2 Manutenção e Cultivo da Cultura e Estudo para Determinar a Fonte de Carbono a Ser Utilizada na Produção da Lipase

Os fungos foram mantidos sob refrigeração, a 4 °C, em meio de conservação Batata Dextrose Agar (BDA). Eles foram repicados a cada dois meses em BDA inclinado e incubados a 30 °C por 7 dias, sendo, em seguida, conservados em geladeira a 4 °C. Ressalta-se que os fungos foram repicados com o auxílio de uma alça de platina em uma capela de fluxo laminar.

Os conídios foram ativados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 g de glicose e 20 mL de água destilada, e, após esterilização a 120 °C por 20 min., uma suspensão contendo  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup> foi produzida, sendo a mesma determinada em câmara de Neubauer. Essa suspensão constituída pelos fungos foram inoculados dessa forma e nessa concentração em todos os ensaios fermentativos de obtenção da lipase presentes neste estudo.

Importante ressaltar que os fungos também foram cultivados em meio de cultura líquido, com alteração da fonte de C para a manutenção de suas células em um meio similar ao que foi usado para a produção da lipase. As fontes de C para manutenção foram as seguintes: azeite de oliva (5% de acidez) 30 g.L<sup>-1</sup>, glicerina P.A. (Química Moderna, gold) 30 g.L<sup>-1</sup>, óleo de soja (Liza), sendo testadas de forma isolada, uma de cada vez em cada meio nutritivo. O caldo de cultivo continha ainda a peptona bacteriológica (HIMEDIA, Biosciences Company) na concentração de 70g.L<sup>-1</sup> e os sais inorgânicos NaNO<sub>3</sub> (1g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1g.L<sup>-1</sup>) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5g.L<sup>-1</sup>), atuando como fontes de nitrogênio, potássio e magnésio, respectivamente. Esses elementos foram necessários para a manutenção celular dos fungos. Ressalta-se que os meios foram devidamente autoclavados a 121 °C por 15 minutos separadamente.

Para a determinação da fonte de carbono a ser utilizada na produção da lipase, foram realizados experimentos, baseados nas metodologias de Andrade *et al.* (2012) e de Rodrigues *et al.* (2016), variando-se a concentração de nitrogênio e de tween para três fontes de carbono (óleo de soja, azeite de oliva e glicerina purificada do rejeito da produção de biodiesel) pré-selecionadas, cujas concentrações também variaram. Vale salientar que, para cada caldo nutritivo, foi utilizada uma das fontes de carbono que estão em estudo. A Tabela 6 apresenta a composição dos dois caldos utilizados nessa seleção. Além dos compostos citados na Tabela 6, foram também adicionados em ambos os caldos 0,24g de  $K_2PO_4$  e 0,12g de  $MgSO_4$  e água destilada q.s.p. para 150 mL.

**Tabela 6** – Composição dos caldos nutritivos utilizados na seleção da fonte de carbono.

	<b>Caldo A</b>	<b>Caldo B</b>
Fontes de N: Peptona + $NaNO_3$	0,75 g + 0,135 g	1,5 g + 0,27 g
Fonte de C	3 mL	6 mL
Tween 20	0,75 mL	1,5 mL

Os cultivos foram realizados sob agitação orbital a 32 °C e 150 rpm, em incubadora tipo “shaker”, durante 96 h, em frascos de Erlenmeyer contendo 150 mL de cada caldo (A e B) em duplicata; em cada frasco foi inoculada uma suspensão de  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, determinada em câmara de Neubauer, contendo a subcultura da linhagem de *R. oryzae* URM 4692.

Foram coletadas, em tubos Eppendorf, alíquotas de 1mL a cada 24 h e imediatamente congeladas para posteriores análises.

### 3.5 PRODUÇÃO DE LIPASE ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para a avaliação e otimização da produção da lipase pela linhagem proposta (potencialmente selecionada em outros trabalhos, como Andrade *et al.* (2012) e Rodrigues *et al.* (2016)), foi realizada uma fermentação em estado líquido.

Foi montado um planejamento experimental variando-se a concentração das fontes de nitrogênio (peptona e nitrato ( $NaNO_3$ )), de carbono (glicerina residual) e a quantidade do emulsificante Tween 20, mantendo-se o pH inicial constante, 6,0 (corrigido com NaOH.0,1M).

As massas de  $K_2PO_4$  e  $MgSO_4$  adicionadas foram mantidas em 0,24 g e 0,12 g, sendo completado o volume do caldo com água até 150 mL em balão volumétrico. A Tabela 7 apresenta os valores superiores, centrais e inferiores utilizados no planejamento.

**Tabela 7** – Variáveis a serem estudadas no planejamento experimental 2<sup>3</sup>, referente à produção da lipase.

	(-)	(0)	(+)
<b>Fontes de N:</b> <b>Peptona + NaNO<sub>3</sub></b>	0,75 g + 0,135 g	1,125 g + 0,2025 g	1,5 g + 0,27 g
<b>Fonte de C</b>	3 mL	4,5 mL	6 mL
<b>Tween 20</b>	0,75 mL	1,125 g	1,5 mL

As variáveis apresentadas na Tabela 8 foram consideradas as variáveis de entrada na elaboração da matriz de planejamento experimental, e a variável resposta analisada foi a concentração da atividade enzimática específica contida na lipase produzida. Ressalta-se que na montagem do planejamento (Tabela 8), as fontes de nitrogênio (peptona e  $NaNO_3$ ) foram agrupadas.

Os cultivos foram realizados sob agitação orbital a 32 °C e 150 rpm, em incubadora tipo “shaker”, durante 96 h, em frascos de Erlenmeyer contendo 150 mL do meio fermentecível em duplicata; em cada frasco foi inoculada uma suspensão de  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup> contendo a subcultura da linhagem de *R. oryzae* URM 4692.

Foram coletadas alíquotas, em tubos de Eppendorf, de 1mL a cada 24 h e imediatamente congeladas para posterior análise.

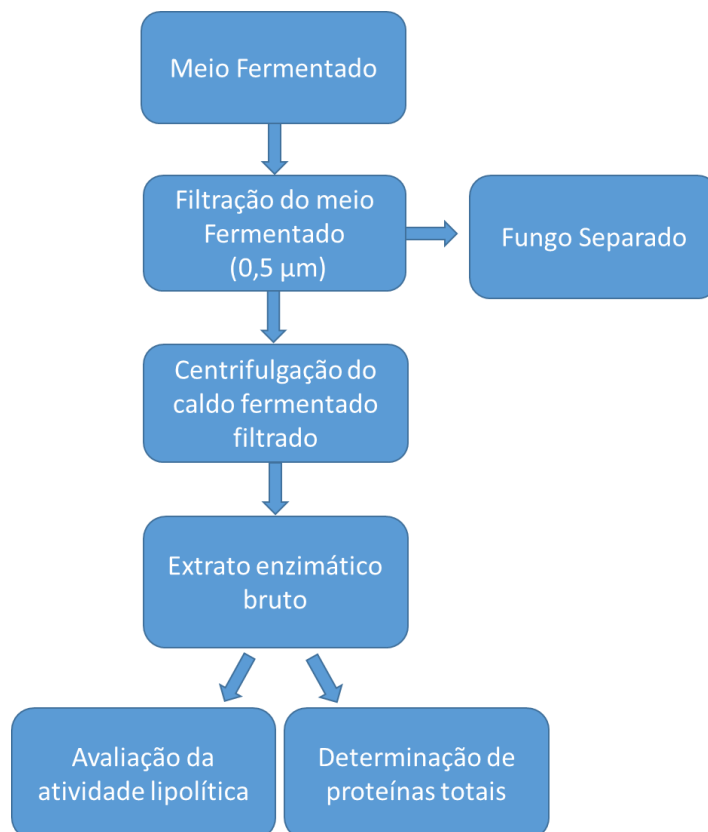
**Tabela 8** – Planejamento experimental 2<sup>3</sup> destinada a produção da lipase

Ensaio	Fonte de C	Fonte de N*	Tween 20
01	-	-	-
02	+	-	-
03	-	+	-
04	+	+	-
05	-	-	+
06	+	-	+
07	-	+	+
08	+	+	+
09 (C)	0	0	0
10 (C)	0	0	0
11 (C)	0	0	0

Fonte de N engloba peptona e NaNO<sub>3</sub>.

Após o processo fermentativo, 20 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,4 estéril foi adicionado ao caldo fermentado, que posteriormente foi filtrado utilizando um filtro comercial micropore (0,5 µm). O filtrado foi então centrifugado a 3.000 rpm por 10 min a 20 °C. Ao sobrenadante contendo a enzima, foram adicionados 15 mM de fluoreto de fenilmetano metilsulfonil (PMSF) e 200 mM de ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA), visando inibir a atividade de proteases presentes. Após 15 min de repouso em temperatura ambiente, o meio foi filtrado em papel-filtro Whattman nº 3. A Figura 4 ilustra o fluxograma de obtenção de lipase bruta microbiana por fermentação submersa (RODRIGUES *et al.*, 2016).





**Figura 4** – Fluxograma de obtenção de lipase bruta microbiana por fermentação submersa.

### 3.5.1 Determinação da Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade enzimática, foi utilizado o método espectrofotométrico (colorimétrico), utilizando um kit de dosagens Lipase (BIOCLIN®). Esse kit é baseado no princípio da hidrólise dos ésteres de glicerol de ácidos graxos de cadeias longas (triacilgliceróis) em diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres. Durante a reação, o substrato em meio tamponado fica estabilizado e adquire uma forma emulsificada (micelas), formando interfaces (lípidos-água) necessárias à ação da lipase (amostra), que, em presença do ácido ditionitrobenzoico (DTNB), forma um cromógeno de cor amarela, proporcional à atividade da lipase na amostra.

A técnica se baseia em marcar dois tubos, C (controle) e A (amostra), conforme está representado na Tabela 9.

**Tabela 9** – Técnica para determinação da atividade enzimática na lipase produzida.

	<b>Controle</b>	<b>Amostra</b>
<b>R1 (Tampão)</b>	1,0 mL	1,0 mL
<b>Amostra</b>	50 µL	50 µL
<b>R2 (Inibidor Enzimático)</b>	-	50 µL
<b>R3 (Ácido ditionitrobenzoico-DTNB)</b>	100 µL	100 µL

R1, R2 e R3 são, respectivamente, os reagentes 1, 2 e 3 do kit de dosagens Lipase da BIOCLIN®.

Os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 2 min para equilibrar a temperatura. Em seguida, adicionou-se 100 µL do reagente R4, composto de: tributirato ditiopropanol 20 mmol.L<sup>-1</sup> e surfactante.

Logo após, os tubos foram homogeneizados e incubados a 37 °C por 30 min. Em seguida, adicionou-se 2,0 mL do reagente R5 (acetona), homogeneizou-se bem e deixou-se em repouso por 3 min.

Os conteúdos foram transferidos dos tubos controle e amostra para 2 tubos de Eppendorf. Foram centrifugados a 3.500 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram transferidos para cubetas de vidro do espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10uv, e determinadas as absorbâncias dos tubos controle e amostra em 410 nm (400–415 nm), acertando o zero com água destilada ou deionizada.

Para determinação da atividade, foi utilizada a seguinte fórmula, fornecida pelo fabricante do kit de dosagem Lipase da BIOCLIN®. A Equação 2 é usada para determinação da atividade enzimática da lipase.

$$LIPASE \left( \frac{U}{L} \right) = ABS \text{ Amostra} - ABS \frac{Controle}{7} \times 1000 \quad (2)$$

### 3.5.2 Determinação da Atividade Específica (Determinação de Proteínas Totais)

Para esse ensaio, foi utilizado o método colorimétrico (espectrofotométrico) com o uso do reagente biureto que em princípio utiliza a energia contida nas ligações peptídicas das proteínas (-

CONH-) que reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das proteínas no meio. A presença do tartarato de sódio e potássio estabiliza o reagente, e a concentração adequada de iodeto de potássio previne a sua autorredução. Os quantitativos utilizados na técnica descrita estão contidos na Tabela 10.

**Tabela 10** – Quantitativos usados na determinação de proteínas totais na lipase.

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Amostra</b>
<b>Amostra</b>	-	-	50 µL
<b>Padrão</b>	-	50 µL	-
<b>Biureto</b>	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL

Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 10 minutos. A absorbância da amostra e do padrão foram lidas a 545 nm (510–550 nm) em um espectrofotômetro Shimadzu.

Para a determinação da atividade específica, foram divididos os valores de atividade lipásica obtidos pelo método descrito anteriormente pelos valores de proteínas totais obtidos pela seguinte expressão, apresentada na Equação 3.

$$Proteínas\ Totais\ \left(\frac{g}{L}\right) = ABS\ da\ \frac{Amostra}{ABSPadrão} \times 0,4\ (conversão\ de\ dL\ para\ L) \quad (3)$$

### 3.6 OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DO EFLUENTE OLEOSO

A capacidade hidrolítica da lipase é influenciada por vários fatores, tais como o pH do meio, a concentração da lipase e a quantidade da goma arábica presente no meio reacional (CARVALHO, 2014). Para investigar e otimizar o efeito dessas variáveis no tratamento do efluente oleoso proveniente do processo de produção do biodiesel, foi realizado um planejamento experimental fatorial  $2^3$  em duplicata, cada qual com três repetições no ponto central.

Tais variáveis foram consideradas as variáveis de entrada na elaboração da matriz de planejamento experimental, em que a variável resposta analisada foi a DQO e o TOG do final do efluente oleoso. A Tabela 11 apresenta os fatores e os níveis do planejamento que foi estudado.

**Tabela 11** – Fatores e níveis do planejamento fatorial  $2^3$  para o processo hidrolítico da lipase.

Fatores	Níveis		
	-	0	+
<b>pH</b>	4,7	7,0	9,3
<b>Volume de goma arábica sol. a 7% (%m.V<sup>-1</sup>) (mL)</b>	0	6	12
<b>Concentração de lipase aplicada (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	6000	9000	12000

A escolha desses valores ocorreu da seguinte forma: em relação à variável pH, o seu valor medido para o efluente bruto foi de 4,7, indicando um certo grau de acidez. De acordo com Carvalho (2014), a lipase apresenta melhores resultados como agente hidrolítico, quando utilizada em soluções com pH próximo da neutralidade. Devido a tal fato, foi avaliada a viabilidade do uso da lipase em função do pH do efluente bruto e referente à sua alcalinização até pH = 9,3. O ponto central utilizado foi 7,0.

Para volumes de aplicação da solução de goma arábica, os níveis escolhidos como mínimo e máximo foram, respectivamente, 0,0 mL e 12,0 mL, devido a experimentos citados na literatura que relatam que entre essas concentrações, se atinge o máximo de eficiência hidrolítica da lipase proveniente de micro-organismos (CARVALHO, 2014).

Com relação aos valores da concentração da lipase que foram escolhidos para aplicação no estudo, são justificados tendo como base o trabalho realizado por Carvalho *et al.* (2014). O planejamento experimental fatorial foi montado conforme a Tabela 12.

**Tabela 12** – Matriz de planejamento fatorial  $2^3$  para o processo hidrolítico usando a lipase oriunda da fermentação com o fungo *Rizhopus*.

Ensaio	pH	Volume de Goma Arábica (Sol. 7 %m/v)	Concentração de Lipase (mg.L <sup>-1</sup> )
01	-	-	-
02	+	-	-
03	-	+	-
04	+	+	-
05	-	-	+
06	+	-	+
07	-	+	+
08	+	+	+
09 (C)	0	0	0
10 (C)	0	0	0
11 (C)	0	0	0

Todos os ensaios com aplicação da lipase em processos de batelada foram realizados adicionando-se a erlenmeyers de 250 mL, com 80 mL do efluente oleoso e pH corrigido com solução-tampão de fosfato de acordo com cada experimento do planejamento experimental. Em cada um dos erlenmeyers, foram adicionadas as devidas quantidades da solução da goma arábica e da lipase recém-preparada, de acordo com cada experimento do planejamento. Foi adotada uma temperatura ideal (37 °C) e uma agitação ótima (200 rpm), visando o máximo de interação entre a lipase e os residuais de óleos e graxas contidos no meio (RIGO, 2004).

Após um período de 24 h, houve a finalização do experimento. Foram retiradas amostras do meio reacional em intervalos de tempo de 1, 2, 3, 4, 5 horas para avaliar a redução da DQO ao longo dos experimentos. Também foram analisados a DQO e o TOG inicial (t = 0) e final (t = 24 h) de cada amostra, ou seja, antes e após o tratamento do efluente.

## 4 RESULTADOS

Nesta seção, estão sendo apresentados os resultados obtidos nos experimentos destinados à produção da lipase e aplicação dessa enzima no tratamento do efluente oleoso proveniente do processo de produção de biodiesel.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

Os resultados obtidos nas análises para determinação dos parâmetros analisados na caracterização do efluente bruto são mostrados na Tabela 13. Como foi necessário adicionar agentes químicos no efluente bruto durante o planejamento fatorial, foi realizada também a caracterização do efluente bruto com os reagentes nas concentrações máximas, conforme o estudo estatístico.

**Tabela 13** – Resultados da caracterização do efluente bruto.

Parâmetro	Valores Medidos Efluente		Valores de Literatura*
	(Bruto)	(Bruto + Químicos)	
pH (a 25°C)	4,7	9,3	5,5
DBO (mg.L <sup>-1</sup> )	1500	1000	2180
DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	294293	290278	88000
Temperatura (°C)	25	25	-
Óleos e graxas vegetais (mg.L <sup>-1</sup> )	7647	7542	6760
Sólidos dissolvidos totais (mg.L <sup>-1</sup> )	1121	4967	2500
Sólidos totais (mg.L <sup>-1</sup> )	19820	40850	23890
Turbidez (NTU)	56,3	136	217
Condutividade (uS/cm)	2,293	10,99	-

**Fonte\*:** Santos (2014); Rocha (2013).

De acordo com Santos (2014), em seu estudo sobre tratamento de efluente de biodiesel pela técnica de coagulação e fenton, o pH encontrado do efluente bruto foi de 5,5, semelhante ao apresentado neste estudo, 4,7. Com relação ao parâmetro DQO, o citado estudo obteve um valor de 88.000 mg.L<sup>-1</sup>, ou seja, bastante diferente do encontrado nesta pesquisa, 294.293,0 mg.L<sup>-1</sup>; entretanto, é importante ressaltar que a qualidade da matéria-prima interfere ativamente nas características do efluente gerado. Ramirez *et al.* (2012) compararam a caracterização dos efluentes provenientes da transesterificação alcalina do óleo de palma e de mamona e observaram

valores de DQO entre 3.681 e 40.975 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, devido principalmente aos fosfolipídios presentes no óleo de mamona. Segundo Leung e Guo (2010), os fosfolipídios são excelentes agentes emulsificantes, como consequência acarretam o aumento de óleo emulsionado no efluente.

Com relação aos estudos realizados por Rocha *et al* (2013) visando tratar efluente de biodiesel com micro-organismos produtores de lipase, o teor de óleos e graxas e de sólidos totais foi de 6.760 mg.L<sup>-1</sup> e 23.890 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, valores estes próximos aos encontrados na pesquisa, 7.647 mg.L<sup>-1</sup> e 19.820 mg.L<sup>-1</sup>.

Nesta pesquisa, escolheu-se como parâmetro de avaliação do tratamento o teor de óleos e graxas (TOG) e a demanda química de oxigênio (DQO), já que os óleos e as graxas e, conseqüentemente, a DQO presentes nos efluentes da indústria de produção de biodiesel estão entre os principais agentes contaminantes a serem removidos nos processos de tratamento, e as empresas produtoras precisam obedecer às normas, cada vez mais rígidas, para descarte de seus efluentes, de forma que existe a necessidade do constante monitoramento dos seus rejeitos (BEZERRA, 2004).

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DA FONTE DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DA LIPASE

Os resultados dos experimentos realizados em duplicata referente à produção da enzima, com o propósito de poder encontrar quais seriam as mais eficientes fontes de carbono, visando conseguir alcançar a máxima concentração de atividade enzimática na lipase estão situados na tabela 14. As Figuras 5, 6 e 7 ilustram graficamente todos os resultados obtidos nessa fase da pesquisa, que se concentrou em determinar os parâmetros ótimos de produção da lipase.

**Tabela 14** – Resultados experimentais de produção de lipase utilizando os caldos A e B.

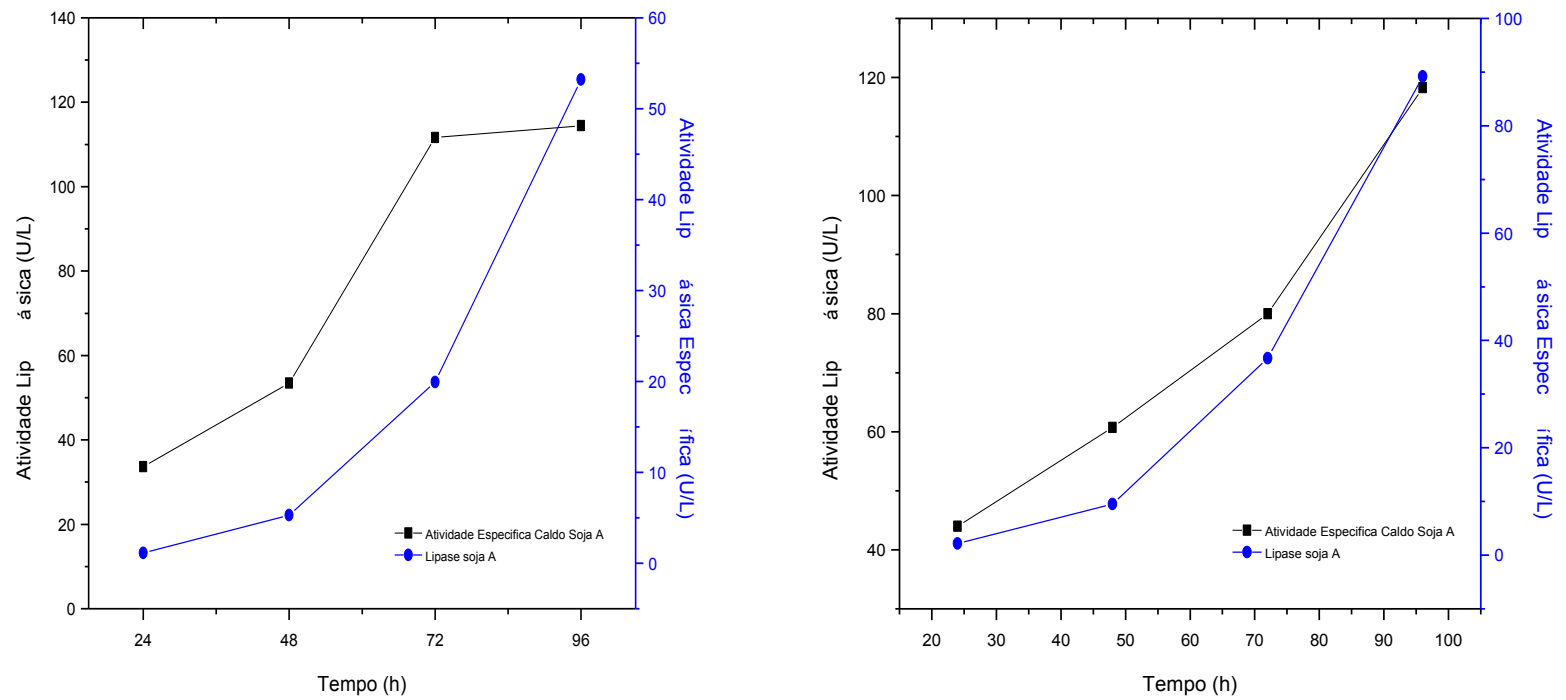
<b>Tratamentos (ENSAIOS)</b>	<b>Atividade Enzimática (U.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Proteína Total (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atividade Enzimática Específica (U. L<sup>-1</sup>)</b>
Fonte Carbono – SOJA- Caldo A – 24 h	1,142857	0,033948	33,6646
Fonte Carbono – SOJA – Caldo A – 48 h	5,285714	0,098893	53,4488
Fonte Carbono – SOJA – Caldo A– 72 h	19,92857	0,178598	111,5835
Fonte Carbono – SOJA – Caldo A – 96 h	53,21429	0,464945	114,4529
Fonte Carbono – SOJA – Caldo B – 24 h	2,142857	0,048708	43,99350
Fonte Carbono – SOJA – Caldo B – 48 h	9,5	0,156458	60,71934
Fonte Carbono – SOJA – Caldo B – 72 h	36,71429	0,459041	79,98048
Fonte Carbono – SOJA – Caldo B – 96 h	89,21429	0,754244	118,2831
Fonte Carbono – AZEITE – Caldo A – 24 h	7,142857	0,1623	43,9935
Fonte Carbono – AZEITE – Caldo A – 48 h	78	0,811808	96,08182
Fonte Carbono – AZEITE – Caldo A – 72 h	105,5	0,96679	109,124
Fonte Carbono – AZEITE – Caldo A– 96 h	166,4286	1,031734	161,3095
Fonte Carbono – AZEITE – Caldo B – 24 h	2,214286	0,078229	28,30526
Fonte Carbono – AZEITE – Caldo B – 48 h	8,5004	0,121033	70,22865
Fonte Carbono – AZEITE – Caldo B – 72 h	26,28571	0,153506	171,2363
Fonte Carbono – AZEITE – Caldo B – 96 h	58,42857	0,292251	199,926
Fonte Carbono – GLICERINA – Caldo A – 24 h	6,428571	0,04428	145,1786
Fonte Carbono – GLICERINA – Caldo A – 48 h	9,285714	0,054613	170,029
Fonte Carbono – GLICERINA – Caldo A – 72 h	49,28571	0,255351	193,012
Fonte Carbono – GLICERINA – Caldo A – 96 h	62,57143	0,296679	210,9062
Fonte Carbono – GLICERINA – Caldo B – 24 h	11,42857	0,070849	161,3095238
Fonte Carbono – GLICERINA – Caldo B – 48 h	27,0003	0,129889	207,8693182
Fonte Carbono – GLICERINA – Caldo B – 72 h	112,8571	0,37786	298,6746652
Fonte Carbono – GLICERINA – Caldo B – 96 h	181,0714	0,450185	402,2160422



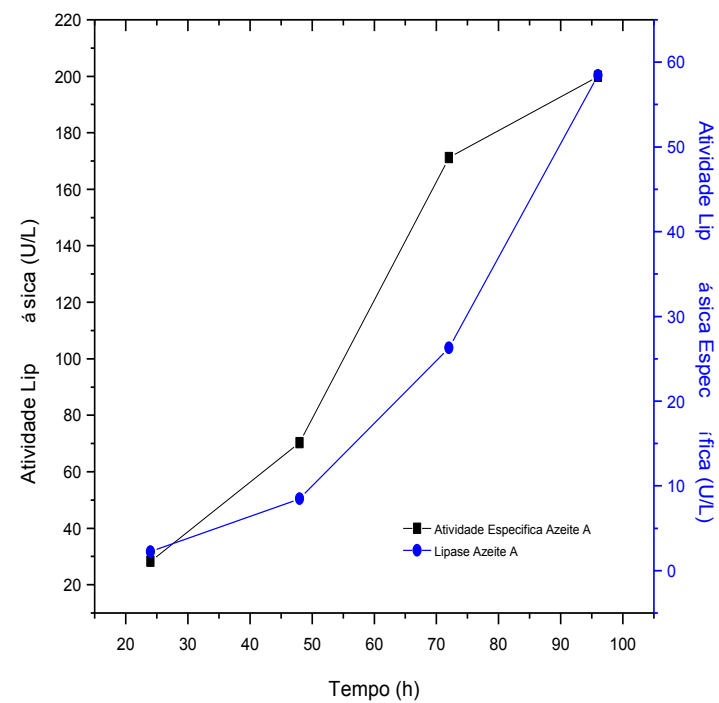
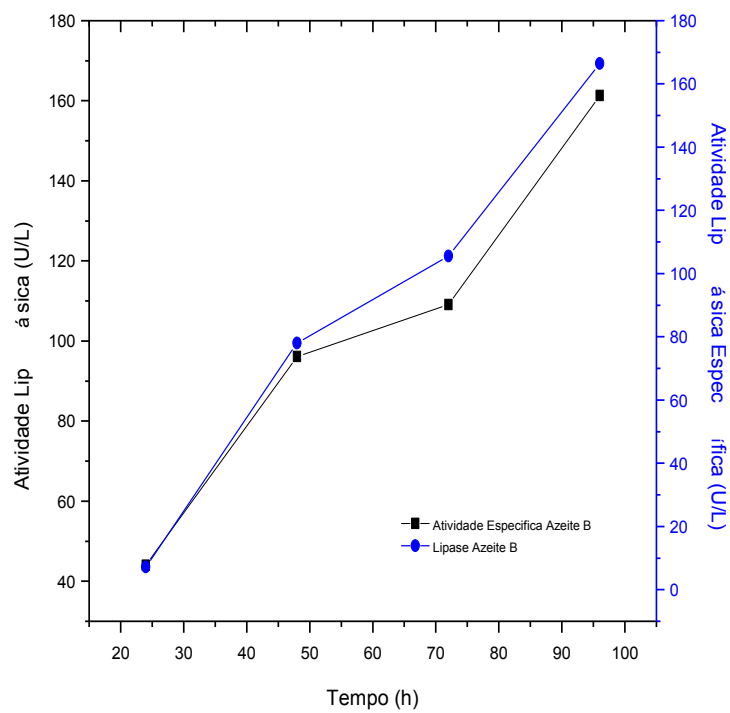
Ao analisar os resultados contidos na Tabela 14 e nos gráficos gerados a partir dela, foi possível identificar que, dentre as fontes de carbono estudadas, a glicerina residual tratada foi a que mostrou ser a mais promissora, pois foram nos meios fermentescíveis constituídos por ela que apresentaram as maiores atividades enzimáticas, atingindo uma concentração máxima superior aos demais resultados onde foram utilizadas outras fontes de carbono.

Ladeira (2014), em sua pesquisa destinada a determinar diferentes indutores para a produção de lipase, utilizando o *Cryptococcus curvatus* nr1 y-1511, usou meio nutritivo contendo glicerina residual, extrato de malte, extrato de levedura, peptona e Tween 80. Durante o experimento, foram retiradas alíquotas dos cultivos para a determinação da atividade lipolítica e produtividade enzimática. Nessas condições, a pesquisa atingiu uma atividade lipolítica máxima de 2.150 U.L<sup>-1</sup> e produtividade enzimática de 0,094 U.mL<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

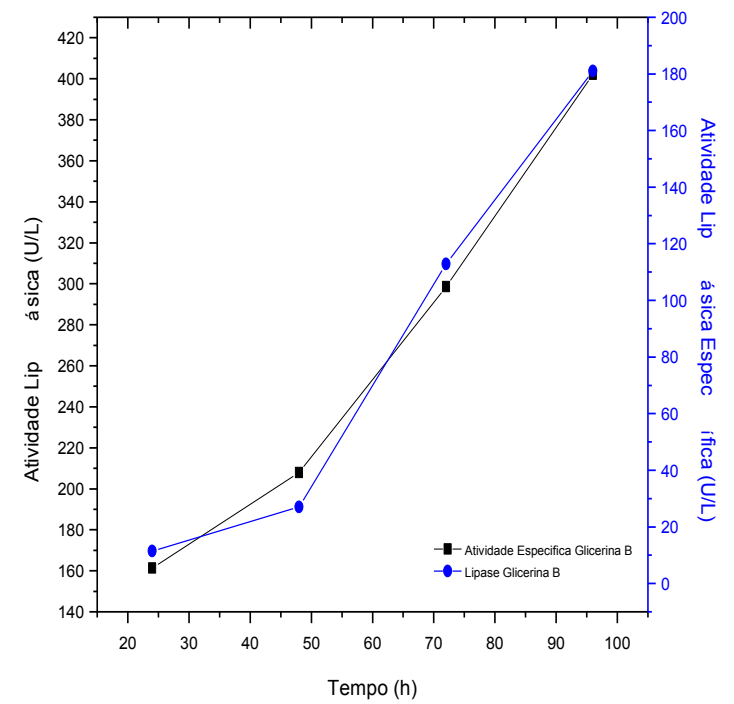
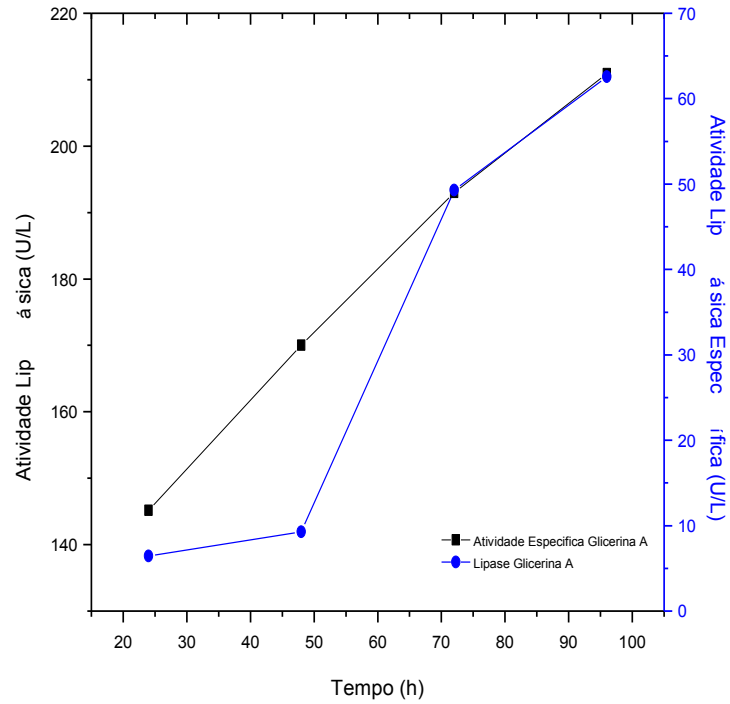
Ressalta-se que a atividade enzimática máxima obtida pelo presente estudo foi de 402 U.L<sup>-1</sup>, no extrato bruto de lipase constituído por glicerina residual tratada, ou seja, concentração esta inferior ao obtido por Ladeira (2014). Entretanto, é importante salientar que valor experimental do presente projeto foi obtido no extrato bruto fermentado, ou seja, sem nenhum tipo de tratamento de purificação da lipase, diferentemente dos experimentos mencionados, que realizaram purificação da enzima produzida.



**Figura 5** – Gráficos 1 e 2: Atividade enzimática da lipase produzida usando o caldo A e o caldo B, constituídos por óleo de soja.



**Figura 6** – Gráficos 3 e 4: Atividade enzimática da lipase produzida usando o caldo A e o caldo B, constituídos por azeite de oliva.



**Figura 7** – Gráficos 5 e 6: Atividade enzimática da lipase produzida usando o caldo A e o caldo B, constituídos por glice

A partir dessa definição, foi realizado o planejamento experimental fatorial, visando avaliar as variáveis: glicerina residual como fonte de carbono, nitrato de sódio e peptona como fonte de nitrogênio e o emulsificante Tween 20, com intuito de determinar quais delas são mais significativas na produção da lipase.

#### 4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL DESTINADO À AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LIPASE

Nesta seção, estão sendo apresentados os resultados obtidos nos experimentos referentes à produção da lipase, que teve o intuito de determinar quais foram as principais matérias-primas utilizadas no processo, com interesse em otimizar a concentração da atividade enzimática do produto gerado.

##### 4.3.1 Planejamento Experimental Fatorial 2<sup>3</sup> de Produção da Lipase

O resultado da atividade enzimática específica para cada ensaio do planejamento fatorial destinado à produção da lipase é apresentado na matriz completa do planejamento, Tabela 15:

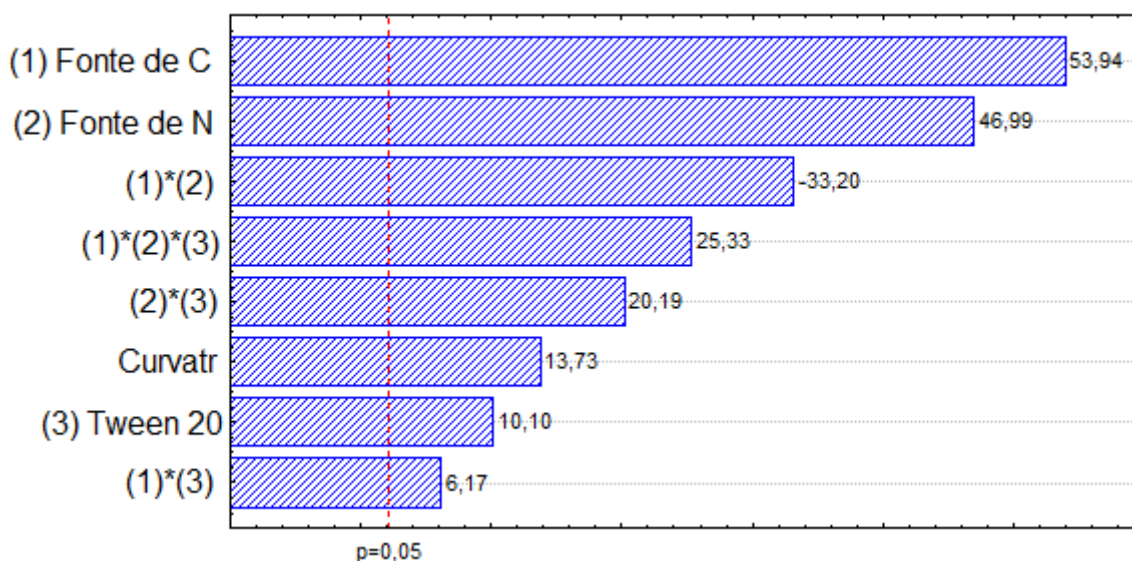
Analisando da Tabela 15, pode-se observar que a maior eficiência referente à obtenção da lipase com o máximo de atividade enzimática foi obtida no experimento com as variáveis fonte de C, fonte de N e Tween 20 em seus níveis superiores (ensaio 19), o qual obteve uma atividade enzimática de 389,62 U.L<sup>-1</sup>.

Importante levar em consideração o resultado da atividade enzimática obtido no ensaio 2 (337,509 U.L<sup>-1</sup>), quando foi utilizado o máximo da fonte de carbono e o mínimo das fontes de nitrogênio e Tween 20. Nesse experimento, foi possível verificar uma eficiência considerável da atividade enzimática, tendo menores custos processuais de materiais de consumo quando comparado com os custos gastos no ensaio 19, que obteve a maior concentração de atividade enzimática no presente estudo.

**Tabela 15** – Matriz completa do planejamento fatorial  $2^3$  para produção de lipase destinada a tratar efluente de biodiesel.

Ensaio	Fonte C (Glicerina)	Fonte de N ( $\text{NaNO}_3$ e Peptona)	Tween 20	Ativ. Enz. Espe ( $\text{U/L}^{-1}$ )
01	-	-	-	153,142
02	+	-	-	337,509
03	-	+	-	300,036
04	+	+	-	276,747
05	-	-	+	170,012
06	+	-	+	284,414
07	-	+	+	296,956
08	+	+	+	379,884
09 (C)	0	0	0	294,756
10 (C)	0	0	0	295,856
11 (C)	0	0	0	295,123
12	-	-	-	149,36
13	+	-	-	329,07
14	-	+	-	294,68
15	+	+	-	281,14
16	-	-	+	163,56
17	+	-	+	281,94
18	-	+	+	293,62
19	+	+	+	389,62
20 (C)	0	0	0	297,01
21 (C)	0	0	0	298,11
22 (C)	0	0	0	297,38

A Figura 8 apresenta o Diagrama de Pareto, que mostra a estimativa dos efeitos principais para as variáveis fonte de C, fonte de N e Tween 20 e seus efeitos de interação. Neste gráfico, as variáveis cujos retângulos estão à direita da linha pontilhada vermelha são as que apresentam efeitos significativos com 95% de confiança. Assim, facilmente se observa que as três variáveis apresentam, isoladamente, efeito significativo na obtenção da lipase, apresentando satisfatórias concentrações de atividade enzimática. Também se percebe que a ação combinada entre as variáveis (duas a duas), além da ação combinada (três a três), também são significativas.



**Figura 8** – Diagrama de Pareto representando a estimativa dos efeitos provocados pelas variáveis fonte de C, fonte de N e Tween 20 e suas interações no processo de produção da lipase, para um ajuste linear.

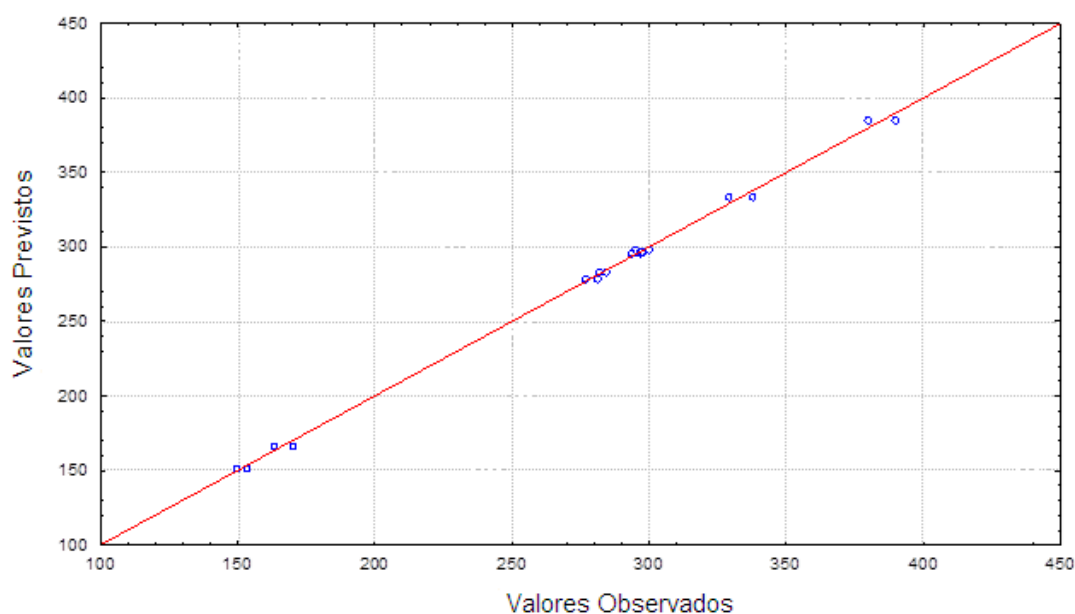
Os ajustes do modelo experimental foram realizados através da Análise de Variância (ANOVA), conforme Tabela 16, em conjunto com a avaliação do gráfico apresentado na Figura 8.

**Tabela 16** – Análise de Variância para o ajuste do modelo empírico aos dados experimentais (ANOVA).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Variação Explicada	Máximo de Variação Explicável
Regressão	86901,35	7	12414,478	97,35%	99,83%
Resíduo	2364,87	14	168,91955		
Falta de ajuste	2212,41	1	2212,4057		
Erro puro	157,57	13	11,72830		
Total	89266,22	21			

Analisando a Tabela 16, foi possível verificar que a regressão consegue explicar 97,35% da variância em torno da média, de um máximo que poderia ser explicado (descontando apenas os erros puros) de 99,83% e, portanto, há uma parcela de 2,4% da variância em torno da média que o modelo não consegue explicar, devido à evidência de falta de ajuste do modelo a 95% de confiança.

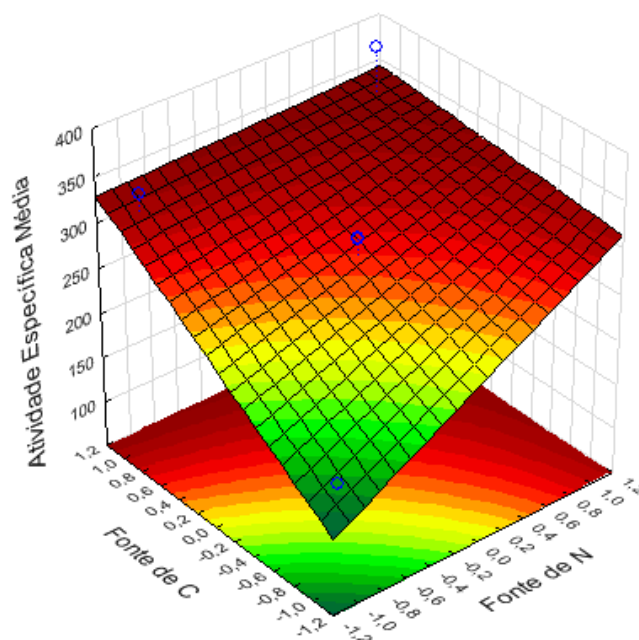
O gráfico da Figura 9 mostra os valores observados experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo. Pode-se observar que o modelo está devidamente ajustado, já que há vários pontos nas proximidades da reta.



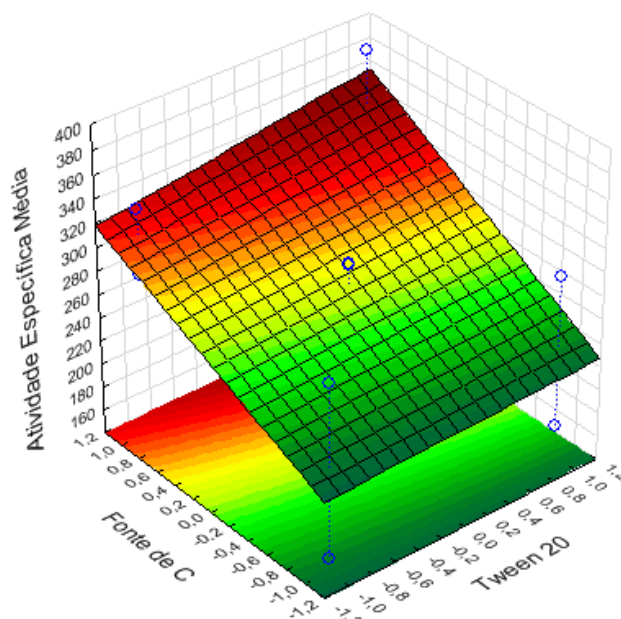
**Figura 9** – Valores observados *vs* valores previstos pelo modelo linear, para a variável dependente atividade enzimática.

A partir dos modelos considerados ajustados, dentro do limite de confiança adotado, foi possível avaliar o comportamento da variável resposta através de gráficos de superfície de resposta para o processo estudado, Figuras 10, 11 e 12.

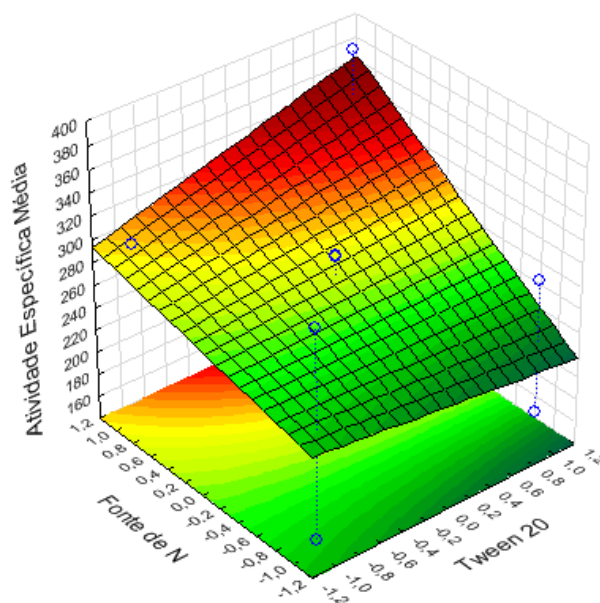




**Figura 10** – Superfície de resposta mostrando a concentração da atividade enzimática específica em função das variáveis fonte de C e fonte de N no processo de produção da lipase.



**Figura 11** – Superfície de resposta mostrando a concentração da atividade enzimática específica em função das variáveis fonte de C e Tween 20 no processo de produção da lipase.



**Figura 12** – Superfície de resposta mostrando a concentração da atividade enzimática específica em função das variáveis fonte de N e Tween 20 no processo de produção da lipase

As regiões de interesse nas Figuras 10, 11 e 12 são as representadas pela cor vermelha, uma vez que elas indicam as regiões com as condições experimentais capazes de fornecer a maior concentração de atividade enzimática na lipase produzida e, conseqüentemente, a maior eficiência no processo de produção da enzima em estudo. Ao analisar tais figuras, percebe-se que as melhores condições experimentais são obtidas à medida que se aumentam as concentrações das fontes de carbono e das fontes de nitrogênio.

De acordo com Sharma et al (2001) e Martins *et al* (2008), as fontes de carbono comumente mencionadas em trabalhos de produção de lipases são essenciais para a obtenção de elevados rendimentos, todavia alguns autores têm produzido lipases na ausência de óleos e graxas com bons rendimentos.

Através da análise das inclinações dos gráficos de superfície de resposta (Figuras 10, 11 e 12) e do Diagrama de Pareto (Figura 8), foi possível constatar que a variável de entrada que apresentou maior influência sobre a variável resposta, no caso a atividade específica média, foi a fonte de C, e, secundariamente, a fonte de N utilizada no processo.

Por fim, foi devidamente constatado que o aumento da quantidade de fonte de C disponível no sistema implica em uma maior eficiência da produção de uma lipase com elevada concentração de atividade enzimática. Tal fato é satisfatório porque essa mesma fonte de C é a

glicerina residual gerada como subproduto da produção do biodiesel, ou seja, existe a possibilidade de viabilidade financeira do processo em estudo.

Segundo Robert *et al* (2017), foi possível se produzir lipase por *Candida antarctica* utilizando a glicerina bruta de produção de biodiesel como fonte de carbono, com intuito de minimizar o custo do meio de cultura utilizado para a geração da enzima. O estudo das melhores condições possibilitou um aumento significativo da produção da lipase. As condições de cultura ótimas utilizando meio nutritivo contendo glicerol bruto como fonte de carbono tinham uma concentração de 25 g.L<sup>-1</sup> da fonte de carbono. A lipase produzida foi caracterizada e comparada com a lipase comercialmente disponível de *Aspergillus niger*, vendida pela Novozymes. A lipase produzida mostrou-se estável em pHs básicos e temperaturas inferiores a 55 °C, sendo as melhores condições pH 7,0 e 30 °C.

Ao comparar os resultados obtidos pelas literaturas científicas com os alcançados pelo presente estudo, referente ao processo de produção da lipase, foi possível constatar uma concordância no que se refere ao fato da fonte de carbono ser a variável mais importante na obtenção da máxima eficiência de produção da lipase microbiana.

Após a geração dos gráficos de superfície, já discutida anteriormente, gerou-se a equação para tal modelo. A Tabela 17 apresenta os limites de confiança dos efeitos estimados e seus respectivos coeficientes de regressão, que devem compor o modelo empírico matemático para o processo de produção da lipase que está sendo estudada no presente projeto.

**Tabela 17** – Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para produção da lipase.

<b>Efeito</b>	<b>Estimativa</b>	<b>Limite de Confiança (95%) -</b>	<b>Limite de Confiança (95%) +</b>
Média global (constante)	280,00	279,27	280,73
FN	46,19	45,33	47,04
FC	40,23	39,37	41,08
TW	8,64	7,79	9,50
FN*FC	-28,42	-29,28	-27,57
FN*TW	5,28	4,42	6,13
FC*TW	17,29	16,43	18,15
FN*FC*TW	21,69	20,83	22,55

A partir dos dados obtidos pelo estudo estatístico, foi possível gerar um modelo empírico no formato equacional, descrito na Equação 4. Ressalta-se que os parâmetros contidos na equação são estatisticamente significativos com 95% de confiança.

$$AEM = 280,00 + 46,16FN + 40,23FC + 8,64TW - 28,42FN * FC + 5,28FN * TW + 17,29FC * TW + 21,69FN * FC * TW \quad (4)$$

na qual AEM =Atividade Esp. Média; FN = Fonte de N (P+N), FC = Fonte de C e TW = Tween 20.

#### 4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL REFERENTE AO TRATAMENTO DO EFLUENTE OLEOSO COM A LIPASE EM FUNÇÃO DA REMOÇÃO DA DQO E DO TOG

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos nos experimentos referentes ao tratamento do efluente oleoso de biodiesel com a lipase, visando determinar a remoção da DQO e do TOG.

##### 4.4.1 Planejamento Experimental Fatorial 2<sup>3</sup> avaliado pela variável resposta DQO

O resultado obtido para DQO de cada ensaio do planejamento fatorial destinado ao tratamento do efluente proveniente do processo de biodiesel, por tratamento enzimático usando o extrato bruta da lipase, é apresentado na matriz completa do planejamento, Tabela 18.

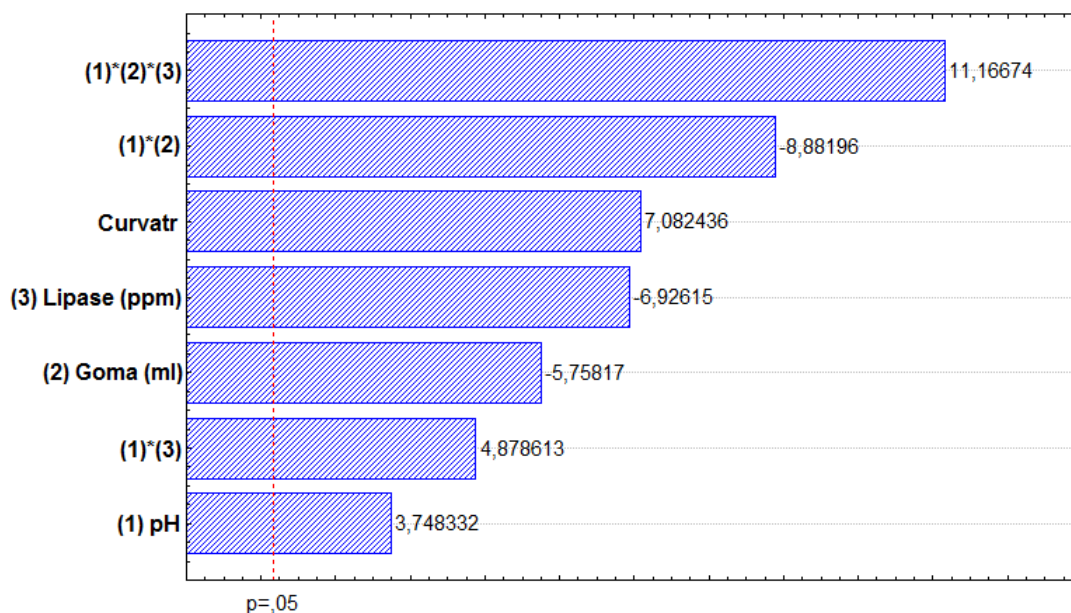
Ao analisar a Tabela 18, pode-se observar que a mais eficiente remoção de DQO foi obtida no experimento 7, que utilizou o pH em seu ponto mínimo, o volume de goma a 7% m.V<sup>-1</sup> e concentração de lipase em seus níveis superiores, obtendo uma DQO no valor de 207.783,6 mg.L<sup>-1</sup>.

Importante levar em consideração o resultado da DQO obtido no ensaio 1 (217541,8 mg.L<sup>-1</sup>), quando foram utilizados valores mínimos de todas as variáveis estudadas. Nesse experimento específico, foi possível verificar uma eficiência de remoção de DQO de 26,0%, tendo o menor custo processual referente à utilização de materiais de consumo quando comparado com os custos gastos no ensaio 7, que obteve a maior eficiência de remoção de DQO no presente estudo, 29,4%.

**Tabela 18** – Matriz completa do planejamento fatorial  $2^3$  para o tratamento efluente de biodiesel por tratamento enzimático usando a lipase. Resultados de DQO.

Ensaio	pH	Goma (ml)	Lipase (ppm)	DQO (mg.L <sup>-1</sup> )
01	-	-	-	217541,8
02	+	-	-	242030,6
03	-	+	-	231979,0
04	+	+	-	210499,0
05	-	-	+	215013,2
06	+	-	+	225710,2
07	-	+	+	207783,6
08	+	+	+	220983,6
09 (C)	0	0	0	228235,2
10 (C)	0	0	0	228435,0
11 (C)	0	0	0	228395,2
12	-	-	-	218583,2
13	+	-	-	235097,0
14	-	+	-	232985,0
15	+	+	-	208563,0
16	-	-	+	217595,6
17	+	-	+	220644,2
18	-	+	+	209526,8
19	+	+	+	219976,2
20 (C)	0	0	0	228035,4
21 (C)	0	0	0	228035,6
22 (C)	0	0	0	228395,2

A Figura 13 apresenta o Diagrama de Pareto, que mostra a estimativa dos efeitos principais para as variáveis pH, vol. solução de goma arábica, concentração de lipase aplicada e seus efeitos de interação. Ao avaliar o gráfico, observa-se que as três variáveis apresentam, isoladamente, efeito significativo na remoção de DQO. Também se percebeu que a ação combinada entre as variáveis (duas a duas), além da ação combinada (três a três), possuem significância estatística.



**Figura 13** – Diagrama de Pareto representando a estimativa dos efeitos provocados pelas variáveis pH, vol. solução de goma arábica e concentração de lipase aplicada e suas interações no processo de aplicação da lipase no efluente, para um ajuste linear, em função da variável DQO.

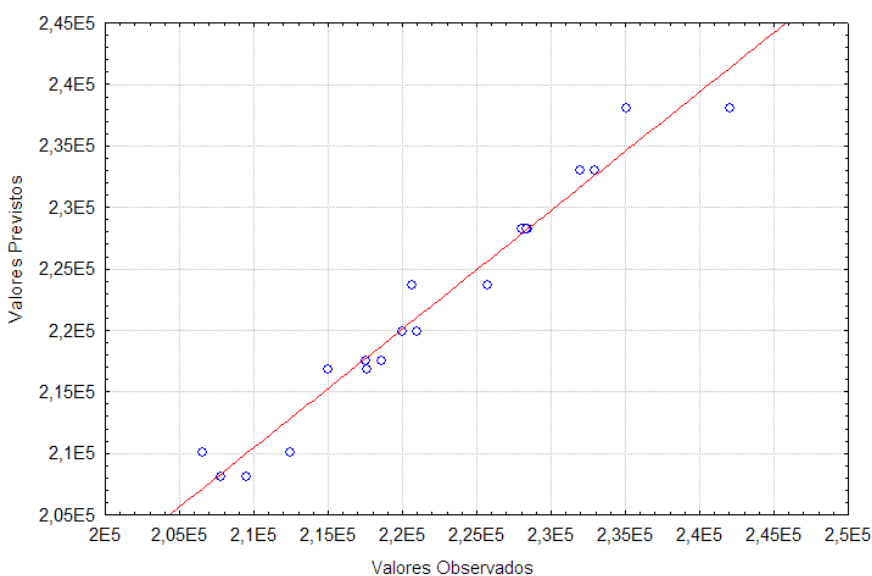
Os seus ajustes foram discutidos através da ANOVA, conforme Tabela 19, em conjunto com a avaliação do gráfico demonstrado na Figura 13.

**Tabela 19** – ANOVA para ajuste de um modelo linear para a lipase atuando como agente degradante de DQO.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Variação Explicada	Máximo de Variação Explicável
Regressão	1750821017,4	7	250117288	96,39%	96,64%
Resíduo	656169960,6	14	4686925,7		
Falta de ajuste	4551395,5	1	4551395,5		
Erro puro	61065565,0	13	4697351,16		
Total	1816437978,0	21			

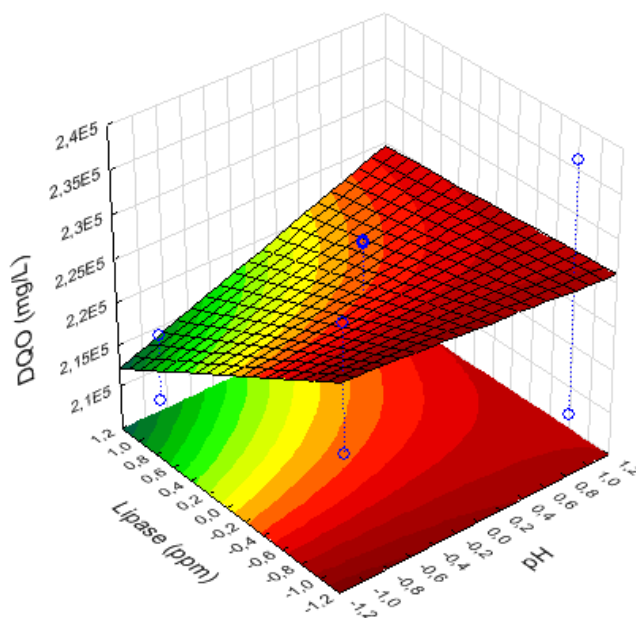
Analisando a Tabela 19, é possível verificar que a regressão consegue explicar 96,39% da variância em torno da média, de um máximo que poderia ser explicado (descontando apenas os erros puros) de 96,64% e, portanto, há uma parcela de 0,2% da variância em torno da média que o modelo não consegue explicar, devido à evidência de falta de ajuste do modelo com 95% de confiança.

A Figura 14 mostra os valores observados experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo. Pode-se observar que o modelo está devidamente ajustado, já que há vários pontos nas proximidades da reta.

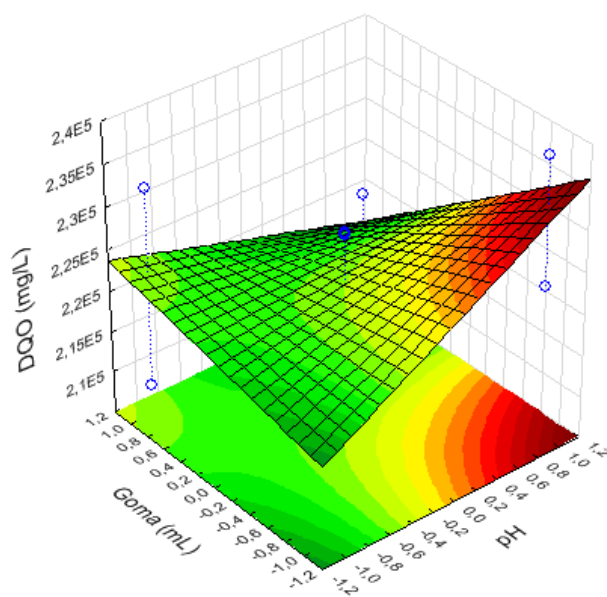


**Figura 14** – Valores observados vs valores previstos pelo modelo linear, para a variável dependente demanda química de oxigênio (DQO) contida no efluente

A partir dos modelos considerados ajustados, dentro do limite de confiança adotado, foi possível avaliar o comportamento da variável resposta através de gráficos de superfície de resposta para o processo estudado, Figuras 15, 16 e 17.

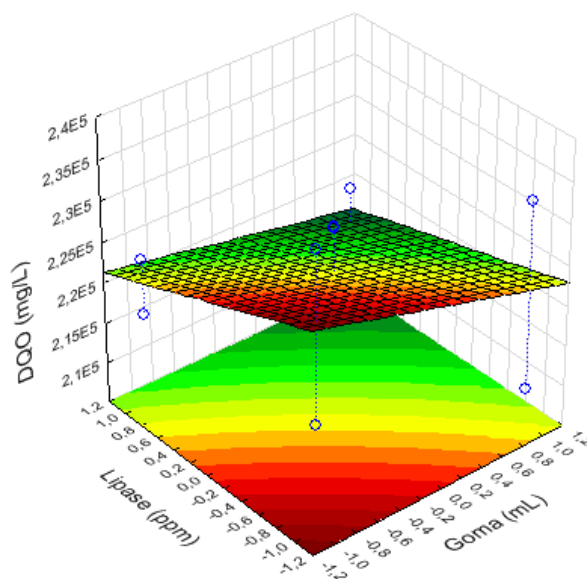


**Figura 15** – Superfície de resposta mostrando a DQO em função das variáveis vol. solução de goma arábica e pH no processo de tratamento do efluente com a lipase.



**Figura 16** – Superfície de resposta mostrando a DQO em função das variáveis concentração de lipase aplicada e pH no processo de tratamento do efluente com a lipase.





**Figura 17** – Superfície de resposta mostrando a DQO em função das variáveis concentração de lipase aplicada e vol. solução de goma no processo de tratamento do efluente com a lipase.

As regiões de interesse nas Figuras 15, 16 e 17 são as representadas pela cor verde, uma vez que elas indicam as regiões com as condições experimentais capazes de fornecer a menor concentração de DQO no efluente pré-tratado após a aplicação da lipase e, conseqüentemente, a maior eficiência no processo de degradação dos óleos e das graxas provenientes da aplicação da enzima. Ao analisar tais figuras deslocando-se nas superfícies, conclui-se que as melhores condições experimentais foram obtidas à medida que se aumentaram as concentrações de aplicação da lipase e os volumes de solução de goma arábica aplicada no processo.

Através da análise das inclinações dos gráficos de superfície de resposta (Figuras 15, 16 e 17) e do Diagrama de Pareto (Figura 13), foi possível concluir que, quando avaliada individualmente, a variável de entrada que apresentou maior influência sobre a variável resposta (DQO) foi a concentração de aplicação de lipase e, secundariamente, o vol. de solução de goma arábica utilizada no processo.

Após a obtenção dos gráficos de superfície, gerou-se a equação para tal modelo. A Tabela 20 apresenta os limites de confiança dos efeitos estimados e seus respectivos coeficientes de regressão, que devem compor o modelo empírico matemático para o processo de pré-tratamento de efluente de biodiesel a partir da aplicação da lipase que está sendo estudada no presente projeto.

**Tabela 20** – Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para o tratamento do efluente a partir da aplicação da lipase, em função da DQO.

<b>Efeito</b>	<b>Estimativa</b>	<b>Limite de Confiança (95%) -</b>	<b>Limite de Confiança (95%) +</b>
Média global (constante)	222911,1	222741,0	223081,2
pH	2030,9	1831,4	2230,4
G	-3119,9	-3319,4	-2920,4
L	-3752,9	-3952,4	-3553,4
pH*G	-4812,6	-5012,1	-4613,1
pH*L	2643,5	2444,0	2843,0
G*L	533,3	333,8	732,8
pH*G*L	6050,6	5851,1	6250,1

A partir dos dados obtidos pelo estudo estatístico, foi possível gerar um modelo empírico no formato equacional, descrito na Equação 5, capaz de prever a DQO contida no efluente pré-tratado pela lipase. Ressalta-se que os parâmetros contidos na equação são estatisticamente significativos a 95% de confiança.

$$DQO = 222911,1 + 2030,9pH - 3119,9G - 3752,9L - 4812,6pH * G + 2643,5pH * L + 533,3G * L + 6050,6pH * G * L \quad (5)$$

na qual DQO = Demanda química de oxigênio; pH = Potencial hidrogeniônico, G = Solução de goma arábica a 7% m.V<sup>-1</sup> e L = Concentração de aplicação da lipase.

#### 4.4.2 Planejamento Experimental Fatorial 2<sup>3</sup> Avaliado pelo Parâmetro TOG

O resultado de TOG para cada ensaio do planejamento fatorial destinado ao tratamento do efluente de biodiesel por tratamento enzimático usando a lipase é apresentado na matriz completa do planejamento, Tabela 21.

**Tabela 21** – Matriz completa do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para o tratamento efluente de biodiesel por tratamento enzimático usando a lipase. Resultado de TOG.

Ensaio	pH	Goma (ml)	Lipase (ppm)	TOG Vegetal (mg.L <sup>-1</sup> )
01	-	-	-	478
02	+	-	-	2032
03	-	+	-	1502
04	+	+	-	126
05	-	-	+	936
06	+	-	+	2139
07	-	+	+	912
08	+	+	+	76
09 (C)	0	0	0	2899
10 (C)	0	0	0	3841
11 (C)	0	0	0	3206
12	-	-	-	383
13	+	-	-	2694
14	-	+	-	861
15	+	+	-	733
16	-	-	+	867
17	+	-	+	1313
18	-	+	+	984
19	+	+	+	60
20 (C)	0	0	0	2535
21 (C)	0	0	0	3220
22 (C)	0	0	0	3202

Ao analisar a Tabela 21, pode-se observar que a mais eficiente remoção de TOG foi obtida no experimento 19, que utilizou todos os parâmetros em estudo em quantidades máximas. Ressalta-se que esse ensaio obteve um resultado de  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  de TOG, atingindo com isso uma remoção de 99,2% da referida impureza.

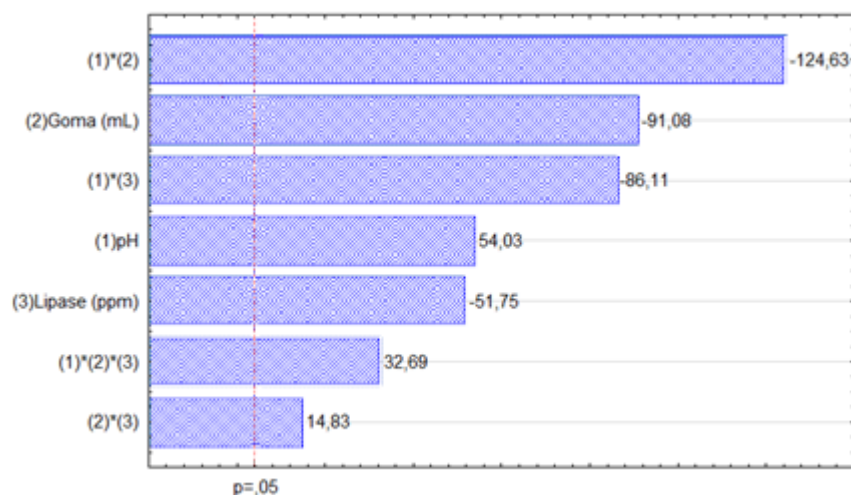
É válido considerar o resultado de TOG obtido no ensaio 12 ( $383 \text{ mg.L}^{-1}$ ), quando foram utilizados valores mínimos de todas as variáveis estudadas. Nesse experimento, foi possível verificar uma eficiência de remoção de TOG de 95,0%, tendo o menor custo processual referente à utilização de materiais de consumo quando comparado com os custos gastos no ensaio 19.

De acordo com Song *et al.* (2011), seus resultados de tratamento de águas oleosas com lipase de *Yarrowia lipolytica* mostraram que, durante 72 h de tratamento, houve uma remoção de 97,6% de TOG. Dumore e Mukhopadhyay (2012) usaram lipase de triacilglicerina imobilizada na remoção de óleo e graxa de águas residuais oleosas sintéticas. Seus resultados demonstraram que cerca de 48% de óleo e graxa e 47% de DQO foram removidos usando  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  de lipase imobilizada.

Segundo com Rocha (2010), utilizando micro-organismos produtores de lipase destinados ao tratamento de efluente de biodiesel, houve uma remoção de 37,3% de DQO e 80,1% de TOG.

Quando comparados os valores de remoção de DQO e TOG apresentados nas literaturas com os valores de remoções obtidos pela presente pesquisa, percebeu-se que houve similaridade com relação às eficiências de remoção dos parâmetros estudados. Ao analisar os resultados, foi possível perceber que a maior eficiência alcançada no presente estudo atingiu uma remoção de 29,4 % de DQO, ou seja, próximo ao resultado de remoção alcançado por Rocha (2010), e uma remoção de TOG de 99,2%, ou seja, superior aos valores obtidos nas pesquisas científicas expostas neste trabalho.

A Figura 18 apresenta o Diagrama de Pareto, que mostra a estimativa dos efeitos principais para as variáveis pH, vol. solução de goma arábica, concentração de lipase aplicada e seus efeitos de interação. Neste gráfico, facilmente se observa que as três variáveis apresentaram, isoladamente, efeito significativo na remoção de TOG, sendo as variáveis goma e pH as que apresentaram maior efeito significativo. Também se percebe que a ação combinada entre as variáveis (duas a duas), além da ação combinada (três a três), são significativas.



**Figura 18** – Diagrama de Pareto representando a estimativa dos efeitos provocados pelas variáveis pH, vol. solução de goma arábica e concentração de lipase aplicada e suas interações no processo de aplicação da lipase no efluente, para um ajuste linear, em função da variável TOG.

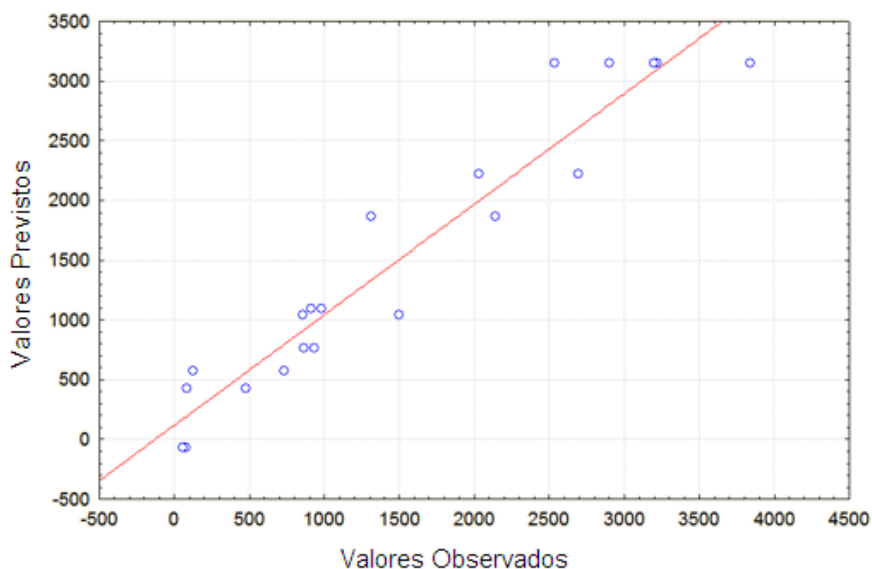
Os ajustes do modelo experimental foram realizados através do ANOVA, conforme Tabela 22, em conjunto com a avaliação do gráfico apresentado na figura 18.

**Tabela 22** – ANOVA para ajuste de um modelo linear para a lipase atuando como agente degradante de óleos e graxas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Variação Explicada	Máximo de Variação Explicável
Regressão	28382403,36	7	4054629,05	92,56%	93,60%
Resíduo	2281708,50	14	162979,17		
Falta de ajuste	319225,00	1	319225,00		
Erro puro	1962483,50	13	150960,26		
Total	30664111,86	21			

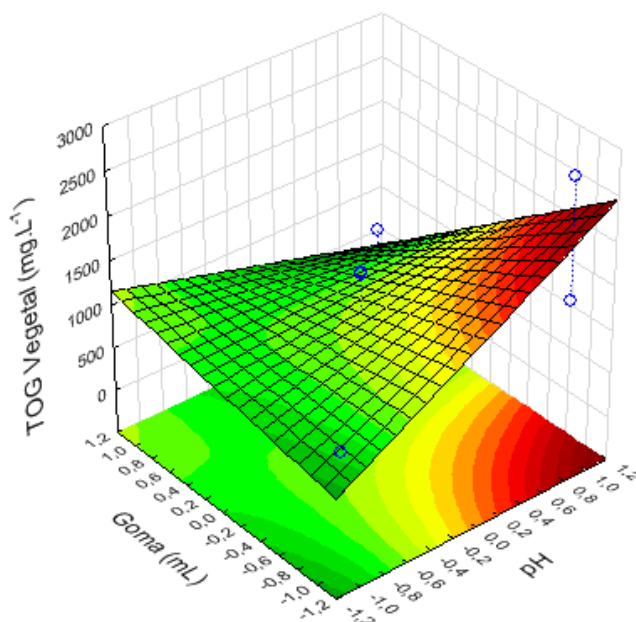
Analisando a Tabela 22, é possível verificar que a regressão consegue explicar 92,56% da variância em torno da média, de um máximo que poderia ser explicado (descontando apenas os erros puros) de 93,60% e, portanto, há uma parcela de 1,0% da variância em torno da média que o modelo não consegue explicar, devido à evidência de falta de ajuste do modelo a 95% de confiança.

O gráfico da Figura 19 mostra os valores observados experimentalmente *versus* os valores previstos pelo modelo. Pode-se observar que o modelo está devidamente ajustado, já que há vários pontos nas proximidades da reta.

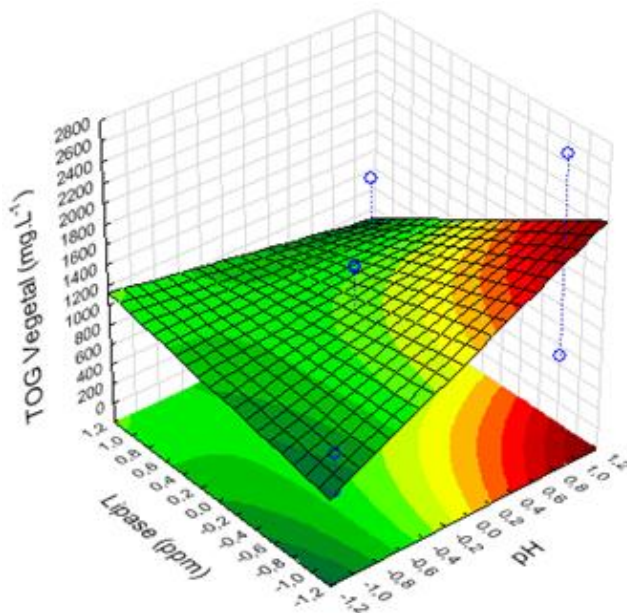


**Figura 19** – Valores observados *vs* valores previstos pelo modelo linear, para a variável dependente teor de óleos e graxas (TOG) contida no efluente.

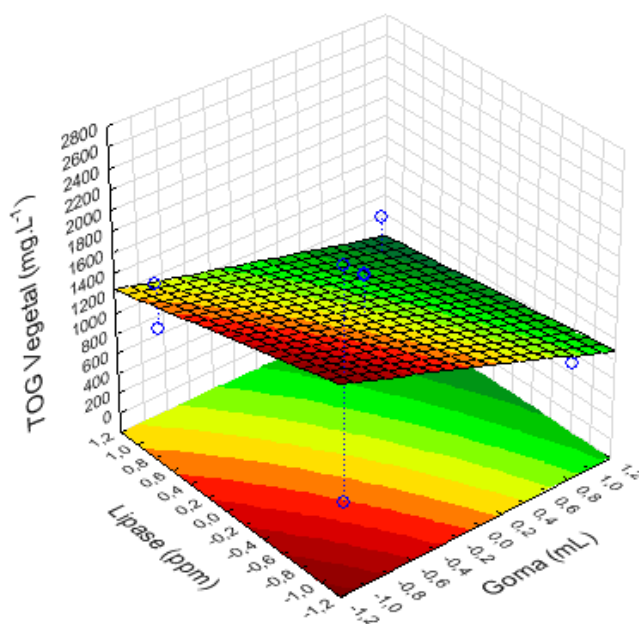
A partir dos modelos considerados ajustados, dentro do limite de confiança adotado, foi possível avaliar o comportamento da variável resposta através de gráficos de superfície de resposta para o processo estudado, Figuras 20, 21 e 22.



**Figura 20** – Superfície de resposta mostrando o TOG em função das variáveis vol. solução de goma arábica e pH no processo de tratamento do efluente com a lipase.



**Figura 21** – Superfície de resposta mostrando o TOG em função das variáveis concentração de lipase aplicada e pH no processo de tratamento do efluente com a lipase.



**Figura 22** – Superfície de resposta mostrando o TOG em função das variáveis concentração de lipase aplicada e vol. solução de goma arábica no processo de tratamento do efluente com a lipase.

As regiões de interesse nas Figuras 20, 21 e 22 estão representadas pela cor verde, uma vez que elas indicam as regiões com as condições experimentais capazes de fornecer a menor concentração de TOG no efluente pré-tratado e, conseqüentemente, a maior eficiência no processo de remoção de óleos e graxas a partir da aplicação da lipase. Ao analisar tais figuras, percebe-se que a melhor condição experimental foi obtida à medida que se aumentou a aplicação da solução de goma no processo, confirmando o resultado apresentado no Diagrama de Pareto (Figura 19), que indica que, dentre as variáveis avaliadas individualmente, a solução de goma foi a que se mostrou mais significativa em relação às demais, secundariamente, o pH utilizado no processo.

Após a geração dos gráficos de superfície, já discutida anteriormente, gerou-se a equação para tal modelo. A Tabela 23 apresenta os limites de confiança dos efeitos estimados e seus respectivos coeficientes de regressão, que devem compor o modelo empírico matemático para o processo de pré-tratamento de efluente de biodiesel a partir da aplicação da lipase que está sendo estudada no presente projeto.



**Tabela 23** – Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão para o tratamento do efluente a partir da aplicação da lipase, em função do TOG.

Efeito	Estimativa	Limite de Confiança (95%) -	Limite de Confiança (95%) +
Média global (constante)	1138,455	1124,787	1152,122
pH	201,250	185,223	217,277
G	-339,250	-355,277	-323,223
L	-192,750	-208,777	-176,723
pH*G	-464,250	-480,277	-448,223
pH*L	-320,750	-336,777	-304,723
G*L	55,250	39,223	71,277
pH*G*L	121,750	105,723	137,777

A partir dos dados obtidos pelo estudo estatístico, foi possível gerar um modelo empírico no formato equacional, descrito na Equação 6. Ressalta-se que os parâmetros contidos na equação são estatisticamente significativos com 95% de confiança.

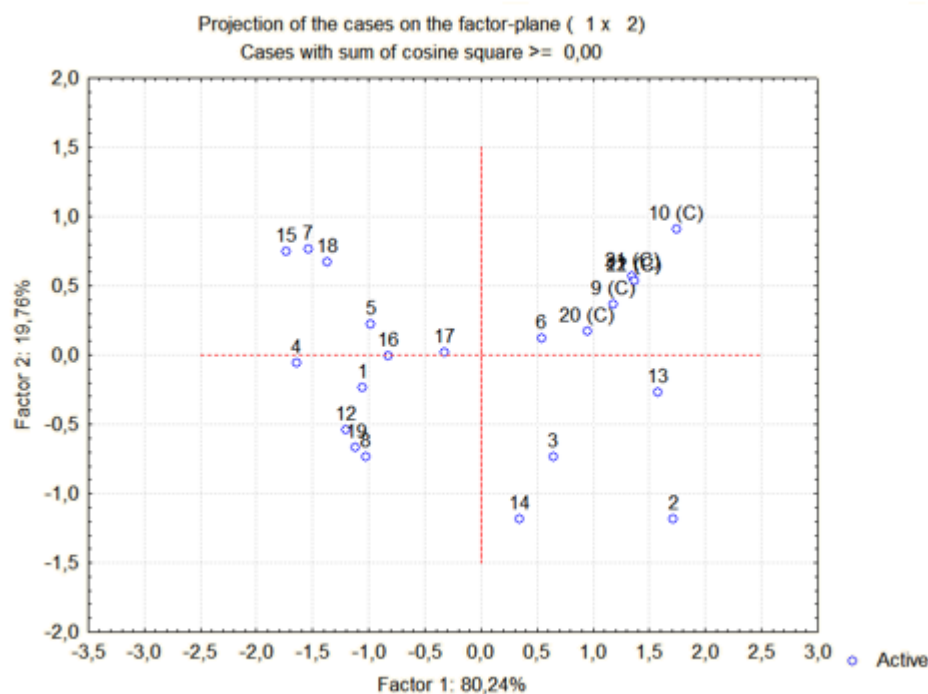
$$TOG = 1138,45 + 201,25pH - 339,25G - 192,75L - 464,25pH * G - 320,75pH * L + 55,25G * L + 121,75pH * G * L \quad (6)$$

na qual TOG = Teor de óleos e graxas; pH = Potencial hidrogeniônico, G = Solução de goma arábica a 7% m.V<sup>-1</sup> e L = Concentração de aplicação da lipase.

#### 4.4.3 Correlação entre os Resultados de Remoção de DQO e TOG do Efluente Pré-tratado com a Lipase

A análise de componentes principais (PCA) é um método explicativo multivariado utilizado para reduzir o número de parâmetros usados em um estudo estatístico, com intuito de reter apenas aqueles que são os mais significativos, visando a explicação de alguns fenômenos. Essa técnica tem sido amplamente utilizada na resolução de casos em que se deseja determinar se há correlação entre fatores distintos (RAGNO, 2007). A matriz de dados construída no estudo, constituída por 22 linhas (amostras investigadas) e 2 colunas (variáveis resposta usadas no planejamento (DQO e TOG)), foi submetida à análise de PCA. Os componentes apontaram

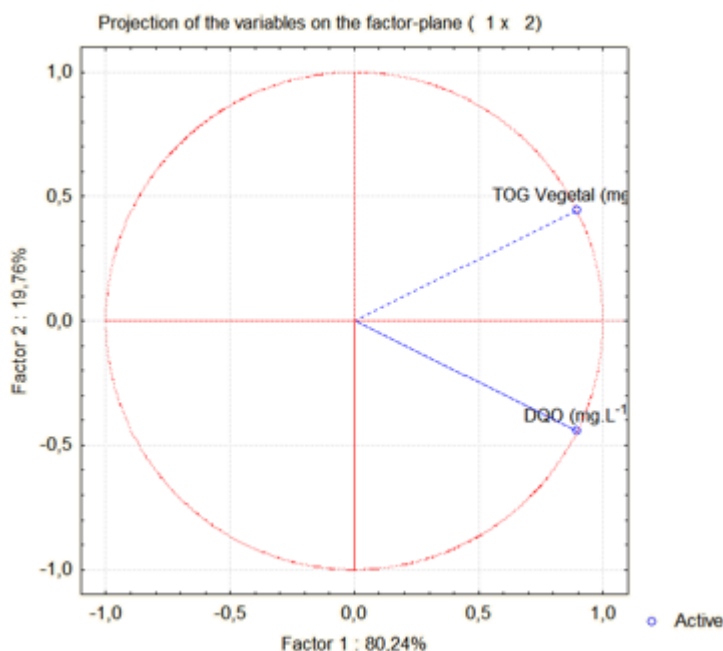
100,00% de variância, com o componente Factor 1 contribuindo 80,24% e o componente Factor 2 contribuindo 19,76%, conforme ilustra a Figura 23.



**Figura 23:** PCA projeção das variáveis no plano do fator

Como é possível visualizar no gráfico acima, todos os pontos utilizados no estudo de análise de componentes principais encontram-se dentro dos quadrantes, confirmando, portanto, que há um indicativo de que as variáveis TOG e DQO apresentam uma correlação positiva entre si, referente às suas remoções. A Figura 24 expressa a projeção das variáveis no plano do fator.

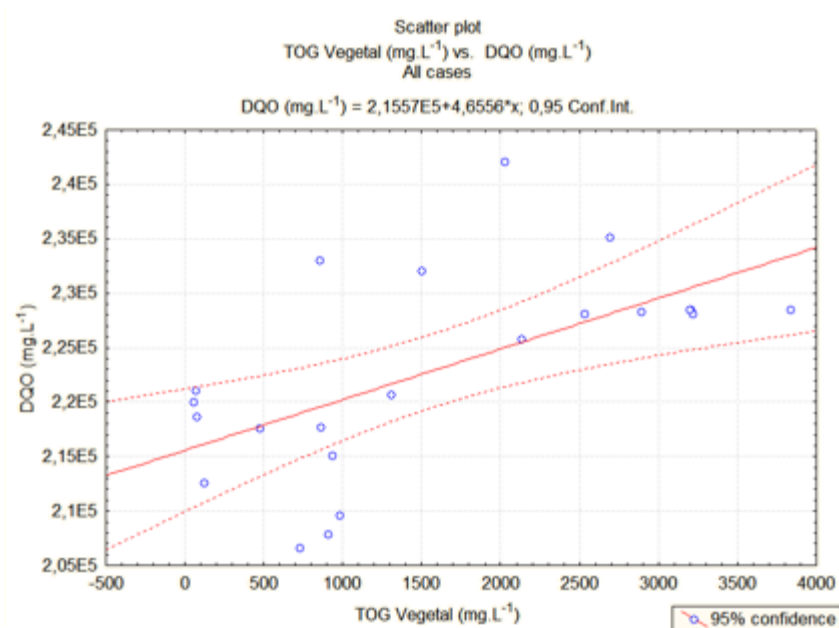
Os eixos representam a variabilidade explicada pelos dois fatores principais simulados no programa (F1 e F2).



**Figura 24:** Projeção das variáveis no plano di fator. Os eixos representam a variabilidade explicada pelos dois fatores principais (F1 e F2).

O PCA mostrado na Figura 24 confirmou a dependência entre si das variáveis TOG vegetal e DQO avaliadas pela técnica de fatores não correlacionados. De fato, as variáveis estudadas apresentaram-se às margens das bordas da projeção no plano fatorial ( $F1 \times F2$ ), equidistantes do ponto central, com uma inclinação em relação ao eixo não correlacionado (eixo horizontal). A Figura 25 consiste no gráfico de dispersão TOG vegetal ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) vs DQO ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), gerado a partir da PCA.

O PCA mostrado na Figura 24 confirmou a dependência entre si das variáveis TOG vegetal e DQO avaliadas pela técnica de fatores não correlacionados. De fato, as variáveis estudadas apresentaram-se às margens das bordas da projeção no plano fatorial ( $F1 \times F2$ ), equidistantes do ponto central, com uma inclinação em relação ao eixo não correlacionado (eixo horizontal). A Figura 25 consiste no gráfico de dispersão TOG vegetal ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) vs DQO ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), gerado a partir da PCA



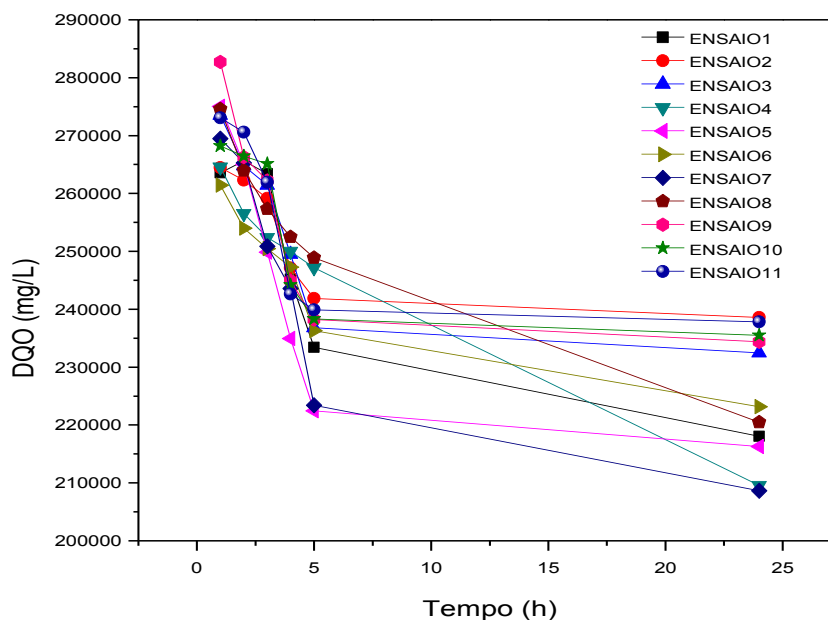
**Figura 25** – Gráfico de dispersão TOG vegetal (mg.L<sup>-1</sup>) vs DQO (mg.L<sup>-1</sup>), gerado a pelo PCA.

Com a avaliação do Gráfico 26, constatou-se que as variáveis resposta estudadas no planejamento estatístico se correlacionam através de uma análise de componente principal. Os valores de TOG e DQO apresentaram uma correlação positiva com 95% de confiança, conforme pode ser visualizado no citado gráfico, onde a grande maioria dos valores usados no planejamento encontra-se dentro das margens de 95% de confiabilidade do presente estudo.

#### 4.4.4 Avaliação da Remoção de DQO Aplicando a Lipase e os Insumos Propostos no Planejamento Fatorial em Função do Tempo

Durante os ensaios realizados para o desenvolvimento do planejamento fatorial experimental, destinado a avaliar a eficiência do tratamento do efluente oleoso de biodiesel com o extrato bruto de lipase, foram coletadas amostras dos meios reacionais em tempo determinado, visando avaliar a cinética de degradação da DQO através da implantação da tecnologia proposta. A Figura 26 apresenta a evolução referente à degradação da DQO contida no efluente, devido à ação da atividade hidrolítica da lipase aplicada, durante 24 h de processo.

Importante ressaltar que o referido gráfico foi gerado a partir das médias dos valores de DQO provenientes dos ensaios em duplicatas, com intuito de deixar a figura com menos informações, sendo mais fácil de visualizar e interpretar as informações contidas nela. A Figura 27 demonstra as amostras experimentais após 24 h de degradação hidrolítica das cargas orgânicas contidas no efluente.



**Figura 26** – Estudo da degradação de DQO do efluente oleoso com aplicação de lipase.

As médias de DQO mínima e máxima dos ensaios realizados em duplicata foram de 208.655,2, referente aos ensaios 7 e 18, e 238.563,8  $\text{mg.L}^{-1}$ , referente aos ensaios 2 e 13, para o tempo de 24 h. A degradação da DQO foi mais expressiva durante as 24 h de reação para os ensaios 7 e 18, 4 e 15, 5 e 16, 1 e 12, 8 e 19 e 6 e 17. Para os demais ensaios, a partir de 5 h de reação o valor da DQO permaneceu praticamente constante. Logo, pressupõe-se que houve hidrólise total dos triacilglicerídeos do efluente, sendo demonstrado através da remoção da DQO. A maior variação de redução dos valores de DQO entre todos os ensaios foi observada durante as 5 primeiras horas de hidrólise, indicando que a sua degradação tendeu à estabilização após esse período.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesta seção, estão sendo apresentadas as conclusões referentes aos resultados obtidos nos experimentos destinados à produção da lipase e aplicação dessa enzima no tratamento do efluente oleoso proveniente do processo de produção de biodiesel. Também estão sendo expostas perspectivas futuras de ações que poderão otimizar as técnicas utilizadas neste estudo.

### 5.1 CONCLUSÕES

A presente pesquisa estudou de produção de lipase através de micro-organismo filamentoso, o fungo *Rhizopus oryzae*, pelo processo de fermentação submersa. Avaliou também a implementação da tecnologia de hidrólise de óleos e graxas e remoção de DQO através da aplicação da referida enzima no tratamento do efluente oleoso de biodiesel.

De modo geral, as principais conclusões obtidas ao final desta pesquisa são citadas abaixo.

O processo de fermentação submersa utilizado na pesquisa para obtenção da lipase foi eficiente, tendo em vista que foi possível obter enzima bruta sem que houvesse a utilização de técnicas de purificação no produto gerado, com uma atividade enzimática máxima de 389,62 U.L<sup>-1</sup>, ou seja, similar e em alguns casos superior ao que se encontra em literaturas científicas. Ressalta-se que, durante a produção da enzima, foi utilizada como fonte de carbono a glicerina residual proveniente do próprio processo produtivo de biodiesel; conforme o planejamento fatorial realizado, atuando com 95% de confiança, foi possível constatar que esta foi a variável mais significativa dentre todas as estudadas, mesmo as demais também sendo significativas. Logo, esse resultado mostrou que o resíduo agroindustrial utilizado na pesquisa foi a principal variável que originou uma eficiente produção de lipase.

Em relação ao tratamento do efluente de biodiesel com a lipase, foi possível constatar, tomando como base o planejamento fatorial desenvolvido, atuando também numa faixa de 95% de confiança, que, tomando como a variável resposta o TOG, a principal variável significativa dentre as utilizadas no estudo foi a concentração de aplicação da solução de goma arábica a 7% m.V<sup>-1</sup>. Já tomando a DQO como variável resposta do planejamento experimental, a principal variável significativa foi a concentração de aplicação da lipase. Importante ressaltar que, em

ambos os planejamentos experimentais, todas as três variáveis estudadas (pH, concentração de lipase, quantidade de goma arábica a 7% m.V<sup>-1</sup>) foram consideradas significativas estatisticamente.

Ao analisar ainda mais o estudo estatístico, foi possível perceber que a máxima eficiência hidrolítica da lipase ocorreu durante a aplicação de 12000 ppm de lipase, 12 mL goma num pH 9,3 atingindo a redução de 99,2% de TOG contido no efluente oleoso.

Tais resultados indicam que o tratamento proposto, mesmo atingindo remoções consideráveis de TOG e DQO, ainda não permite o descarte do efluente tratado em corpos d'água, segundo a resolução CONAMA 357/2005.

## 5.2 PERSPECTIVAS

- Estudar a utilização de outros resíduos agroindustriais que atuem como fontes de carbono e nitrogênio durante o processo de síntese da lipase.
- Avaliar a utilização de técnicas de purificação da lipase bruta com intuito de concentrar e intensificar sua ação hidrolítica na degradação das cargas oleosas contidas nos efluentes.
- Avaliar outras fontes de goma que sejam encontradas em abundância no mercado, como, por exemplo, a de mandioca e de outras raízes e cereais, visando sua aplicação conjunta com a lipase no efluente oleoso.
- Avaliar a redução de outros contaminantes da água residual de biodiesel como por exemplo, metais pesados.
- Fazer um estudo econômico detalhado dos processos estudados.
- Ampliar os estudos para uma escala piloto.
- Realizar um pós-tratamento de coagulação-floculação com a utilização do biocoagulante ação no efluente de biodiesel pré-tratado com aplicação de lipase.

## REFERÊNCIAS

- ALANDER, J.; ANDERSON, A. C.; BAGGE, C.; BRINGSARVE, K.; HJORTH, M.; JOHANSSON, M.; GRANROTH, B.; NORBERG, S.; PEDERSEN, M.; PERSSON, M.; WENNERMARK, B.; WENNERMARK, M. **Handbook of vegetable oils and fats**. 2. ed., AarhusKarlshamn AB: Sweden, 2007.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183-188, 2012.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Resolução N° 42 de 10/12/2012** (Federal) – Disponibiliza os Termos e Condições Gerais de Compartilhamento de Faixas de Servidão. 2012. Disponível em: <<http://bit.ly/1VpwvGu>>. Acesso em: 29 dez. 2016.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Baltimore: Port City Press. 2005.
- ARRUDA BOTELHO, C. A. V. **Viabilidade técnica e aspectos ambientais do biodiesel etílico de óleos residuais de fritura**. Programa de Pós-Graduação em Energia. EP / FEA / IEE/ IF / USP, 2012.
- AVELLANEDA, F.; SALVADÓ, J. Continuous transesterification of biodiesel in a helicoidal reactor using recycled oil. **Fuel processing technology**, v. 92, n. 1, p. 83-91, 2011.
- BAILEY, A. E.; HUI, Y. H. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5. ed. p. 275-308, New York: John Wiley, v. 5, 2005.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 4. ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2010. 413 p.
- BEZERRA, M. A. S. **Águas de produção de petróleo com vistas a sua utilização na agricultura e geração de vapor**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2004.
- BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n° 357** de 17/03/2005 (Federal) – 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. 2005. Disponível em: <<http://bit.ly/1QidBZN>>. Acesso em: 29 dez. 2016.
- BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução N° 430** de 13/05/2011 (Federal) – Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e



altera a Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. 2011. Disponível em: <<http://bit.ly/1FY24dj>>. Acesso em: 29 dez. 2016.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; GARLAND, C. D.; **Nutritional Aspects as Microalgae Used in Mariculture: A Literature Review**, 1. ed., CSIRO Marine: California, 1989.

CADÓ, R. G.; SANTOS SALAZAR, R. F. dos; VASCONCELLOS, N. J. S. de. Efluente oriundo da produção de biodiesel de soja. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 16, n. 3, p. 467-476, 2014.

CANACKI, M.; OZSEZEN, A. N.; ARCAKLIOGLU, E.; ERDIL, A. Prediction of performance and exhaust emissions of a diesel engine fueled with biodiesel produced from waste frying palm oil. **Expert Systems with Applications**, v. 36, n. 5, p. 9268-9280, 1999.

CARVALHO, L. F. F. *et al.* Aplicação de lipase microbiana no tratamento de resíduos oleosos. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2354-2361, 2014.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicações de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2014.

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

CHAVALPARIT, O; ONGWANDEE, M. Optimizing electrocoagulation process for the treatment of biodiesel wastewater using response surface methodology. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1491-1496, 2009.

CORDEIRO, C. S. *et al.* Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 477-486, 2011.

CORDEIRO, C. S. **Síntese e Caracterização de Biodiesel Etilico para Utilização em Motores do Ciclo-Diesel**. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil, 2003.

CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic, Amsterdam**, v. 5, p. 75-78, 1998.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M. G., SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DAS, S. K.; BHOWAL, J.; DAS, A. R., GUHA, A. K. Adsorption behavior of Rhodamine B on *Rhizopus oryzae* biomass. **Langmuir**. v. 22, p. 7265-7272, 2006.

DE BONI, L. A. B.; GOLDANI, E.; MILCHAREK, C. D.; SANTOS, F. A. dos. Tratamento Físico-químico da Água de Lavagem Proveniente da Purificação do Biodiesel. **Periódico Tchê Química**. v. 4, n. 7, p. 41-50, 2007.

DE BRITO, J. F., DE OLIVEIRA FERREIRA, L., DA SILVA, J. P., RAMALHO, T. C. Tratamento da água de purificação do biodiesel utilizando eletrofloculação. **Quim. Nova**, v. 35, n. 4, p. 728-732, 2012.

DEMIRBAS, A., DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy conversion and management**, v. 52, n. 1, p. 163-170, 2011.

DOMINGOS, A. K. *et al.* The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 416-423, 2007.

DUARTE, S. H.; HERNÁNDEZ, G. L. P.; CANET, A.; BENAIGES, M. D.; MAUGERIA, F.; VALERO, F., Enzymatic biodiesel synthesis from yeast oil using immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. **Bioresour. Technol**, v. 183, p. 175-180, 2015.

DUMORE, N. S.; Mukhopadhyay, M. Removal of oil and grease using immobilized triacylglycerin lipase. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, v. 68, p. 65-70, 2012.

EL-GOHARY, F.; TAWFIK, A.; MAHMOUD, U. Comparative study between chemical coagulation/precipitation (C/P) versus coagulation/dissolved air flotation (C/DAF) for pre-treatment of personal care products (PCPs) wastewater. **Desalination**, v. 252, p. 106-112, 2010.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). **Química Nova**, v.21, n. 1, p.16-19, 1998.

FARIA, W. L.; CARVALHO, L. M.; JÚNIOR, N. M.; VIEIRA, E. D. C.; CONSTANTINO, A. M.; SILVA, C. M.; ARANDA, D. A. Esterificação de ácido graxo para produção de biodiesel. In: **Anais do 12º Congresso Brasileiro de Catálise**. 2003. p. 943-946.

FELIZARDO, P. M. G. **Produção de biodiesel a partir de óleos usados de fritura**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/38894145/felizardo-2003>>. Acesso em: 5 jun. 2011.

FENG, Y.; ZHANG, A.; LI, J.; HE, B. A continuous process for biodiesel production in a fixed bed reactor packed with cation-exchange resin as heterogeneous catalyst. **Bioresour Technol.**, 2011.

FERNANDES JR., W. E. **Planejamento experimental aplicado a um novo separador líquido-líquido utilizado no tratamento de águas residuais contaminadas com petróleo**. Dissertação de Mestrado. Natal, RN: UFRN, 2002.

FERNÁNDEZ, S. R. **Uso de enzimas termoestables en la alimentación animal**. Disponível em: [http://www.engormix.com/uso\\_enzimas\\_termoestables\\_alimentacion\\_s\\_articulos\\_1489\\_AVG.htm](http://www.engormix.com/uso_enzimas_termoestables_alimentacion_s_articulos_1489_AVG.htm). Acesso em: 20 nov. 2007.

FERREIRA, I.M. **Imobilização do fungo *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 e lipase de *Pseudomonas fluorescens* em biopolímeros para aplicações em biocatálise**. Tese de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos. USP. 2016.

FU, Y. Q.; XU, Q.; LI, S.; HUANG, H.; CHEN, Y. A novel multi-stage preculture strategy of *Rhizopus oryzae* ME-F12 for fumaric acid production in a stirred-tank reactor. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 25, p. 1871–1876, 2009.

FU, Y., VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresour. Technol.** v. 79, p. 251-262, 2001.

FU, Y.; YIN, L.; ZHU, H.; JIANG, R. High-efficiency l-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using a novel modified one-step fermentation strategy. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 410-417, 2016.

GABAS, V.G; CAVALCANTI, O. A. Influência da adição da goma arábica em filmes isolados de polímero acrílico. Estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 39, n. 4, 2003.

GIORDANI, R.; MOULIN, A.; VERGER, R. Tributyrolylglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other latices. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1069-1072, 1991.

GOLDANI, E.; DE BONI, L. A. B.; CRESCENTE, C. L. **Tratamento físico-químico dos efluentes líquidos provenientes da purificação do biodiesel**. 2010.

GOMES, M. M. R. **Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo de peixe**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

IGUNNU, E. T.; CHEN, G. Z. Produced water treatment technologies. **International Journal of Low-Carbon Technologies Advance Access**, p. 1-21, 2012.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JARUWAT, P.; KONGJAO, S.; HUNSOM, M. Management of biodiesel wastewater by the combined processes of chemical recovery and electrochemical treatment. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 3, p. 531-537, 2010.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. **Tratamento de esgotos domésticos**. 7. ed. 1087p. 2016.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. **A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology**; Rehm, H. J.; Stader, P., eds.; 1998, vol. 8A, 38.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: a comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 36, n. 3, p. 364-373, 2010.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P.; **Manual de biodiesel**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

KUCEK, K. T.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium and potassium hydroxides. **Journal of American Oil Chemist Society**, v. 84, p. 385-392, 2004.

LADEIRA, B. L., BURKERT, C. A. V. Aproveitamento da glicerina oriunda do biodiesel no cultivo de *Cryptococcus curvatus* nr11 y-1511 para produção de lipase. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. **COBEQ 2014**. Florianópolis, 2014.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 500-518, 2010.

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

LEÃO, L. S. **Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióico**. Rio de Janeiro: UFRJ, Escola de Química, p. 84, 2009.

LEON, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7, p. 483-500, 1998.

LEUNG, D. Y. C.; GUO, Y. Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production. **Fuel Processing Technology**, v. 87, p. 883-890, 2010.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.

MACHADO, S. A. **Estudo da produção de biodiesel a partir do óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) pela rota etílica**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

MARTINS, S. S. S.; AZEVEDO, M. O.; SILVA, M. P.; SILVA, V. P. **Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações**. *Holos*, v. 6, p. 54-76, dez. 2015.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, vol. 31, n. 8, 1942-1947, 2008.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. Redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos empregando lipases pancreáticas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 31-39, 2004.

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

METCALF, EDDY. Inc. **Wastewater Engineering Treatment Disposal Reuse**. 114. ed. New York, McGraw - Hill Book, 2008 1815p. 2015.

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. Definition, characteristics and potential in solid substrate cultivation. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. (Ed). **Solid state fermentation**. New York: Applied Science, 2002. p. 455-467.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2004. p. 365-422.

MURUCI, L. N. M. *et al.* Produção de lipase de *Aspergillus niger* utilizando co-produtos da indústria de refino de óleos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 19., 2012, Búzios, RJ. **Anais**. São Paulo: ABEQ, p. 12104-12112, 2012.

NEVES, T. A. **Tratamento físico-químico dos efluentes líquidos da produção de biodiesel metílico em regime de funcionamento contínuo e batelada**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Edificações e Ambiental) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2011.

NOUREDINI, H. System and process for producing biodiesel fuel with reduced viscosity and a cloud point below thirty-two (32) degrees Fahrenheit. **USPTO Patent nº** 6.174.501. p. 4-14, 2001.

PALOMINO-ROMERO, J. A.; LEITE, O. M.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA, G. R.; SILVA, D. P.; CAVALCANTI, E. B. Tratamentos dos efluentes gerados na produção de biodiesel. Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes. Aracaju-SE. **Química Nova**, vol. 35, n. 2, p. 367-378, 2012.

PATTARALUK, J.; SANGKORN, K.; MALI, H. Management of biodiesel waste water by the combined processes of chemical recovery and electrochemical treatment. **Energy conversion and Management**, p. 531-537, 2010.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.

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

PETERSON, C. L.; HUSTRULID, T. Carbon cycle for rapeseed oil biodiesel fuels. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 2, p. 91-101, 1998.

PISARELLO, M. L.; QUERINI, C. A. Producción de Biodiesel: Cinética de esterificación de ácidos grasos con etanol, 2007. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Catálise**. 2007.

PITAKPOOLSIL, W.; HUNSOM, M. Treatment of biodiesel wastewater by adsorption with commercial chitosan flakes: Parameter optimization and process kinetics. **Journal of Environmental Management**, v. 133, n. 0, p. 284-292, 2014.

PITT, F. D. **Desenvolvimento de metodologia para polimerização do poliglicerol adípico a partir do glicerol residual oriundo da produção de biodiesel**. 2010. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

PURPPAN, D. Environmental evaluation of biofuels. **Periodica Polytechnica. Social and Management Sciences**, v. 10, n. 1, p. 95, 2002.

PÜTÜN, A. E.; ÖZCAN, A.; GERÇEL, H. F.; PÜTÜN, E. Production of biocrudes from biomass in a fixed-bed tubular reactor: product yields and compositions. **Fuel**, 80, p.1371-1378, 2001.

RAGNO, G.; LUCA, M. D.; IOELE, G. A. An application of cluster analysis and multivariate classification methods to spring water monitoring data. **Microchemical Journal**, vol. 87, no. 2, pp. 119-127, 2007.

RAMIREZ, X. M. V.; MEJÍA, G. M. H.; LÓPEZ, K. V. P.; VÁSQUEZ, G. R.; SEPÚLVEDA, J. M. M. Wastewater treatment from biodiesel production via a coupled photo-Fenton-aerobic sequential batch reactor (SBR) system. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 4, p. 824-830, 2012.

RAMOS, L. P. *et al.* Tecnologias de produção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2007.

RAMOS, L. P. *et al.* Tecnologias de produção de biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.

RAMOS, L. P.; KUČEK, K. T.; DOMINGOS, A. K.; WILHELM, H. M. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento** 2003, v. 31, p. 28, 2003.

RATTANAPAN, C.; SAWAIN, A.; SUKSAROJ, T.; SUKSAROJ, C. Enhanced efficiency of dissolved air flotation for biodiesel wastewater treatment by acidification and coagulation processes. **Desalination**, v. 280, n. 1-3, p. 370-377, 2011.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. *Advances in colloid and interface science*, v. 147-148, p. 237-50, 2009.

RIGO, E. **Aplicação de lipases como auxiliar no pré-tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos**. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Dissertação de Mestrado. 95p. 2004.

ROBERT, J. M.; LATTARI, F. S.; MACHADO, A. C.; CASTRO, A. M.; ALMEIDA, R. V.; TORRES, F. A. G.; VALERO, F.; FREIRE, D. M. G. Production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source. **Biochemical Engineering Journal**. p.123-131, 2017.

ROBLES-MEDINA, A.; GONZÁLEZ-MORENO, P. A.; ESTEBAN-CERDÁN, L.; MOLINA-GRIMA, E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 4, p. 398-408, 2009.

ROCHA, D. C. **Pré-tratamento biológico da água residuária de lavagem do biodiesel de óleo de soja por micro-organismos produtores de lipase**. Paraná, 2010.

ROCHA, D. C.; GOMES, B. M.; GOMES, S. D.; SENE, L.; ZENATTI, D. C. Selection of microorganisms producer of lipase for fat removal from biodiesel purification water, **Eng. Agríc.**, v. 33, n. 2, p. 332-340, 2013.

ROCHA, O. R. S. **Avaliação de Diferentes Processos Oxidativos Avançados no Tratamento de Resíduos de Petróleo**. Tese de Doutorado. Natal, RN: UFRN, 2010. 100p.

RODRIGUES, C. *et al.* Isolation and selection of lipase-producing fungi based on lipase activity and hydrolytic potential on soybean oil and grease trap scum. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 507-518, 2016.

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutriente source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochem.**, 2006

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SALIHU, A.; ALAM, Z. M.; ABDULKARIM, I. M.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 58, p. 36-44, 2012.

SANTOS, A. M. M. **Tratamento de efluentes de biodiesel pelo processo combinado de coagulação-floculação e fenton**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2014.

SANTOS, F. S. *et al.* Avaliação da eficiência do processo de coagulação/floculação aplicado ao tratamento primário de efluente da indústria petroquímica. **ENGEVISTA**, v. 16, n. 4, p. 404-413, 2014.

SANTOS, L. K. **Avaliação da aplicação do processo de hidroesterificação na produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade**. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Química. UNESP. 2016.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, S. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 239-247, 2003.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, p. 199-210, 1998.

SELMA, V. C.; COTRIM, L. H. B.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. ASBR applied to the treatment of biodiesel production efluente: effect of organic load and fill time on performance na methane production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 162, p. 2365-2380, 2010.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology advances**, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHAY, E. G. Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. **Biomass and bioenergy**, v. 4, n. 4, p. 227-242, 1993.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A. **Look Back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program - Biodiesel from Algae**. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/24190.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2011.

SHOKROLLAHZADEH, A.; GOLMOHAMMAD, F.; NASERI, N.; SHOKOUHI, H. Chemical Oxidation for removal of hydrocarbons from gas-field produced water. In: 20th International.



Congress of Chemical and process Engineering CHISA, 2012. Prague, Czech Republic. **Procedia Engineering**, 42. p. 942-947, 2012.

SILES, J. A.; MARTÍN, M. A.; CHICA, A. F.; MARTÍN, A. Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource technology**, v. 101, n. 16, p. 6315-6321, 20

SIMÕES, T.; VALERO, F.; TECELÃO, C.; FERREIRA-DIAS, S. Production of human milk fat substitutes catalyzed by a heterologous *Rhizopus oryzae* lipase and commercial lipases. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 91, 411–419, 2014.

SMITH, M. B.; MARCH, J.; **Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure**, 6. ed. New York: Wiley, 2007.

SOLDI, R. A.; OLIVEIRA, A. R.; BARBOSA, R. V.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. Polymethacrylates: Pour point depressants in diesel oil. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3671-3678, 2007.

SONG, H.; ZHOU, L.; ZHANG, L.; GAO, B.; WEI, D.; SHEN, Y. Construction of a whole-cell catalyst displaying a fungal lipase for effective treatment of oily wastewaters. **J. Mol. Catal. B Enzym.**, v. 71, n. 3-4, p. 166-170. 2011.

SRIRANGSAN, A.; ONGWANDEE, M.; CHAVALPARIT, O. Treatment of biodiesel wastewater by electrocoagulation process. **Environ. Asia**, v. 2, p. 15-19, 2009.

STAMENKOVIĆ, O. S.; VELIČKOVIĆ, A.V.; VELJKOVIĆ, V. B. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, n. 11, p. 3141-3155, 2011.

STERGIOU, P. Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKORITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E. M. Advances in lipase-catalysed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846-1859, 2013.

STIDHAM, W. D.; SEAMAN, D. W.; DANZER, M. F. **Method for preparing a lower alkyl ester product from vegetable oil**. U.S. Patent n. 6,127,560, 3 out. 2000.

SUEHARA, K.; KAWAMOTO, Y.; FUJII, E.; KHODA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 100, n. 4, p. 437-442, 2005.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound ‘synthetic lipase’ specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: a comparative investigation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1336-1342, 2008.

TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: **Annals of I Congress of the Brazilian Network of Biodiesel Technology**. 2011.

TISS, A.; CARRIÉRI, F.; DOUCHET, I.; PATKAR, S.; SVENDSEN, A.; VERGER, R. Interfacial binding and activity of lipases at the lipid-water interface: effects of gum arabic and surface pressure. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 26, p. 135-145, 2002.

TOMBINI, J. **Produção de lipase fúngica a partir de subprodutos do processamento de soja**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

UL-HAQ, I.; IDRESS, S.; RAJOKA, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-641, 2002.

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

VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias. URI. 2004.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalizadores da Hidrólise de Triacilgliceróis. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 5, n. 3, p. 42-58, 2012

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto. 3. Ed. Belo Horizonte: DESA, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. 452 p. (Princípio do Tratamento biológico de águas residuais, v. 1)

WISEMAN, A. **Em Handbook of Enzyme Biotechnology**; 3<sup>rd</sup>. ed. London Ellis Horwood Publication, 1995.

ZAGONEL, G.; COSTA NETO, P. R.; RAMOS, L. P. Obtenção de biodiesel a partir da reação de transesterificação de óleo de soja usado em frituras. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Soja; Centro Nacional de Pesquisa de Soja**; Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária; Londrina, PR, 17 a 20 de maio. p. 342, 1999.