

Campus de São Carlos

TRATAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA COM ALTA
CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDIOS EM REATORES
ANAERÓBIOS E EM SISTEMA DE REATORES
COMBINADOS, ENZIMÁTICO-BIOLÓGICO.

DOUGLAS JOSÉ DA SILVA

Prof. Dr. MARCELO ZAIAT

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

DOUGLAS JOSÉ DA SILVA

TRATAMENTO DE ÁGUA RESIDUÁRIA COM ALTA
CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDIOS EM REATORES
ANAERÓBIOS E EM SISTEMA DE REATORES
COMBINADOS, ENZIMÁTICO-BIOLÓGICO

<p>Serviço de Pós-Graduação EESC/USP</p> <p>EXEMPLAR REVISADO</p> <p>Data de entrada no Serviço... 24/08/05</p> <p>Ass.: <i>lesan</i></p>
--

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Hidráulica
e Saneamento

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

São Carlos
2004



DEDALUS - Acervo - EESC



31100052284

Class.	TESE-EESC
Cutt.	5609/11
Tombo	T226/05
Syno	1461133

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento da Informação
do Serviço de Biblioteca - EESC/USP

S586t

Silva, Douglas José da

Tratamento d água residuária com alta concentração de lipídios em reatores anaeróbios e em sistema e reatores combinados, enzimático-biológico / Douglas José da Silva. -- São Carlos, 2004.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-
Universidade de São Paulo, 2004.

Área : Hidráulica e Saneamento.


Orientadora: Prof. Dr. Marcelo Zaiat.

1. Tratamento anaeróbio de efluente.
2. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF).
3. Sistema combinado enzimático-biológico.
4. Lipídios.
5. Óleos.
6. Graxas. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **DOUGLAS JOSÉ DA SILVA**

Tese defendida e julgada em 23-04-2004 perante a Comissão Julgadora:



Prof. Dr. **MARCELO ZAIAT (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADO



Prof. Tit. **EUGENIO FORESTI**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADO



Prof. Tit. **JOSÉ ROBERTO CAMPOS**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADO




Profa. Dra. **DENISE MARIA GUIMARÃES FREIRE**
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)

APROVADO



Prof. Dr. **JOSÉ EDUARDO OLIVO**
(Fundação Universidade Estadual de Maringá/FUEM)

APROVADO



Profa. Tit. **MARIA DO CARMO CALJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Dedico este trabalho

Aos meus pais Messias e Maria dos Anjos pelo exemplo de vida que sempre me passaram.
E à memória do Prof. Dr. Carlos Eduardo Blundi

AGRADECIMENTOS

Escrever os agradecimentos no final do trabalho é no mínimo, arriscado. Talvez nomes de amigos e profissionais responsáveis pela concretização de uma vitória dessas ficassem de fora. O ideal seria registrar cada nome desde o início de tudo.

Cada um sabe o motivo específico pelo nome nesta lista, mas não deixando o protocolo de lado, tenho que elencar alguns nomes impossíveis de não constar na lista principal. Qual a ordem ideal? Por tempo de amizade, por tempo dedicado ao trabalho, pelo apoio técnico, pelo apoio moral, pelo financiamento, ordem alfabética, ordem cronológica,... Assim, agradeço:

- A Deus que é a razão de tudo.
- Aos meus pais Messias e Dos Anjos, pelo exemplo de vida.
- Ao Prof. Zaiat, pela segurança e qualidade esmeradas na orientação. Ao meu amigo, agora o Marcelo, que sabe usar a frase de incentivo certa na hora certa.
- À Karina, que além de uma paciência enorme, sempre me motivou e esteve ao meu lado.
- Aos anjos da guarda do LPB, Beth e Janja.
- À Prof^a Bernadete.
- Aos técnicos Paulo, Júlio, Cidinha, Eloísa, Wagner e Ana Paula, pelas enormes contribuições apresentadas durante o período.
- Ao amigos e companheiros de trabalho, André Mineiro, Marilu, Betão, Arnaldo, Ari, Márcio, André, Luciana...
- À Pavi, Sá, Rose, Flavia, Fernanda, Alex e Fábio.
- Ao amigo Marcelo Modolo, pela divisão da carga nas horas de árduo trabalho.
- Aos amigos Gustavo, Edilson, Marcelo e Murilo.
- Aos amigos que ajudaram na discussão: Rogers, Mércia e Isabel,
- Ao quase clube do churrasco: Fernandão, Claudião, Cássia, Rogers, Samantha, Chico Vela, Olga, André, Luciana....
- À CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 PROCESSO ANAERÓBIO APLICADO AO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	5
3.2 ENZIMAS	7
3.2.1 Enzimas Imobilizadas	9
3.2.2 Seleção do Suporte e do Método para a Imobilização de Enzimas	11
3.2.3 Classificação e Comparação entre os Diferentes Métodos de Imobilização de Enzimas	12
3.2.4 Lipases	13
3.2.5 Imobilização de Lipases	14
3.3 LIPÍDIOS	17
3.4 REATORES ENZIMÁTICOS	18
3.5 TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS CONTENDO LIPÍDIOS	20
3.5.1 Efeitos da presença de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) na digestão anaeróbia	20
3.5.2 Estudos de Biodegradação de Águas Residuárias Contendo Lipídios	22
3.6 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS CONTENDO LIPÍDIOS EM SISTEMAS COMBINADOS	26
3.7 REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO (RAHLF)	28
3.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 DESCRIÇÃO GERAL	31
4.2 ENZIMA	33
4.3 SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA	33

4.4	BIOMASSA ANAERÓBIA – INÓCULO	34
4.5	SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO	34
4.6	REATOR ENZIMÁTICO DE LEITO EXPANDIDO INVERTIDO	34
4.7	REATOR UASB	35
4.8	REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO (RAHLF)	36
4.9	SUBSTRATO SINTÉTICO	37
4.10	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	38
4.11	EXAMES MICROBIOLÓGICOS E ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR	39
4.11.1	Exames Microbiológicos	40
4.11.2	Avaliação da Estrutura da Comunidade Microbiana Presente no RAHLF	40
4.11.3	Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	43
4.12	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
4.12.1	Metodologia de Imobilização da Enzima Lipase em Suporte de Polietileno de Baixa Densidade	45
4.12.2	Avaliação do Procedimento de Imobilização da Enzima	46
4.12.3	Metodologia de Imobilização de Microrganismos Anaeróbios em Espuma de Poliuretano	49
4.12.4	Operação do Sistema Experimental de Biorreatores Contínuos – Sistema Combinado	50
4.12.5	Comparação da Operação do RAHLF e do Reator UASB	51
4.13	FREQÜÊNCIA DAS ANÁLISES	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	ETAPA I – Construção e caracterização dos reatores RELI e RAHLF	55
5.1.1	Avaliação do Procedimento de Imobilização da Enzima	55
5.1.2	Avaliação do Reator Enzimático de Leito Expandido	60
5.2	ETAPA II - Operação e monitoramento do sistema de biorreatores contínuos - sistema combinado	62
5.2.1	Avaliação do Desempenho do Sistema Experimental de Biorreatores Contínuos	62
5.2.2	Avaliação do Desempenho de Reatores Combinados Enzimático-Biológico	62
5.2.3	Considerações Finais da Etapa II	69
5.3	ETAPA III - Operação e monitoramento de duas configurações de reatores anaeróbios (RAHLF e UASB) submetidos às mesmas condições de operação.	70
5.3.1	Comparação entre o Desempenho do RAHLF e do UASB, Alimentados com Água Residuária Contendo Lipídios	71

5.3.2 .	Avaliação do Material Formado nos Interstícios da Espuma de Poliuretano por EDX e por Absorção Atômica _____	77
5.4 .	AVALIAÇÃO CINÉTICA DO PROCESSO ANAERÓBIO DE CONVERSÃO	79
5.5 .	EXAMES MICROBIOLÓGICOS E ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR _____	84
5.5.1 .	Caracterização Microbiológica _____	84
5.5.2 .	Análise da Estrutura e Diversidade Microbiana através da Técnica de PCR/DGGE ____	88
5.5.3 .	Contagem e Caracterização dos Microrganismos Anaeróbios Presentes no RAHLF por meio das Técnicas de Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> (FISH) _____	90
6 .	CONCLUSÕES E SUGESTÕES _____	92
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Classificação dos suportes de acordo com a composição química	10
Figura 3.2: Classificação dos métodos de imobilização de enzimas	12
Figura 4.1: Reator enzimático de leito expandido invertido (RELI)	35
Figura 4.2: Reator UASB	36
Figura 4.3: Reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)	37
Figura 4.4: Representação esquemática do procedimento experimental de imobilização da enzima e determinação da atividade enzimática	46
Figura 4.5: Imobilização dos microrganismos anaeróbios em espuma de poliuretano	50
Figura 4.6: Representação esquemática do sistema experimental de biorreatores contínuos (Etapa II)	51
Figura 4.7: Representação esquemática do sistema experimental (Etapa III)	52
Figura 5.1: Curva padrão de concentração de proteínas, método de Sedmak e Grossberg (1977)	56
Figura 5.2: Perfil temporal da DQO do afluente e do efluente, de amostras bruta e filtrada, no sistema de reatores contínuos.	64
Figura 5.3: Variação da concentração de óleos e graxas para o reator de controle e para o sistema combinado	65
Figura 5.4: Valores de alcalinidade a bicarbonato determinados para o sistema combinado e reator de controle	66
Figura 5.5: Valores de AVT determinados para o reator do sistema combinado e de controle	66
Figura 5.6: Valores de sólidos para o sistema combinado e reator de controle	68
Figura 5.7: Valores de gás metano no sistema combinado e reator de controle	69
Figura 5.8: Valores de DQO para TDH 24 horas no RAHLF ₀₃	72

Figura 5.9: Valores de DQO para TDH 18 horas no RAHLF ₀₃ _____	72
Figura 5.10: Valores de DQO para TDH 12 horas no RAHLF ₀₃ _____	72
Figura 5.11: Valores de DQO para TDH 8 horas no RAHLF ₀₃ _____	73
Figura 5.12: Eficiência de remoção de DQO bruta e DQO filtrada no RAHLF ₀₃ , para os diferentes TDH. _____	73
Figura 5.13: Variação da concentração de CH ₄ , no RAHLF ₀₃ _____	74
Figura 5.14: Foto do reator UASB _____	76
Figura 5.15: Variação da DQO do reator UASB _____	76
Figura 5.16: Variação da concentração de lipídios do reator UASB _____	77
Figura 5.17: Variação de k_1^{app} com a velocidade superficial de líquido _____	80
Figura 5.18: Velocidade de conversão de lipídios em função da relação L/D _____	81
Figura 5.19: Mecanismo cinético simplificado proposto para degradação anaeróbia de lipídios no RAHLF _____	82
Figura 5.20: Perfis espaciais de consumo de substrato e produção e consumo de metabólitos intermediários ao longo do comprimento do RAHLF _____	83
Figura 5.21: Morfologias observadas no início de operação do RAHLF _____	86
Figura 5.22: Morfologias observadas no final de operação do RAHLF _____	87
Figura 5.23: Perfil das bandas padrão do DGGE dos fragmentos do DNAr 16S amplificados com primers 968FGC e 1392R (Bacteria) _____	88
Figura 5.24: Perfil das bandas padrão do DGGE dos fragmentos do DNAr 16S amplificados com primers 1100FGC e 1400R (Archaea), utilizando amostras de reatores RAHLF _____	90
Figura 5.25: Células coradas com DAPI (a, c). Células coradas com a sonda EUB338 (b,d) _____	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: - Comparação entre as características de diferentes métodos de imobilização de enzimas _____	12
Tabela 3.2: Principais características de reatores empregando lipases imobilizadas _____	16
Tabela 4.1: Etapas propostas para o estudo de tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios em reatores anaeróbios e em sistema combinado, enzimático biológico _____	32
Tabela 4.2: Composição da água residuária sintética à base de lipídios _____	38
Tabela 4.3: Parâmetros analisados, métodos e referências bibliográficas _____	39
Tabela 4.4: Programas de amplificação por PCR, para o respectivo Domínio dos fragmentos de DNAr 16S. _____	42
Tabela 4.5: Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação in situ _____	44
Tabela 4.6: Protocolos de hibridação _____	44
Tabela 4.7: Etapa, parâmetro analisado, frequência das análises, pontos de amostragem e tempo total de operação dos sistema _____	54
Tabela 5.1: Valores médios de absorbância, variação de absorbância (ΔA), concentração de proteínas nas soluções enzimáticas disponibilizadas para imobilização e concentração de proteínas no filtrado obtido após a imobilização _____	57
Tabela 5.2: Porcentagem de Recuperação de Proteínas _____	58

Tabela 5.3: Unidades de atividade enzimática para enzimas livres (U_L) e imobilizadas (U_I), em ensaios realizados com substrato preparado com diferentes tensoativos	59
Tabela 5.4: Rendimento de imobilização de enzima.	59
Tabela 5.5: Unidades de atividade enzimática (U), DQO e concentração de Lipídios obtidas no RELI em um período de 24 horas de operação.	60
Tabela 5.6: Parâmetros cinéticos do processo de conversão de lipídios	80
Tabela 5.7: Porcentagens de conversão de lipídios em ácido acético e ácido propiônico, em função do TDH	83
Tabela 5.8: Ocorrência e morfologias observadas ao longo do RHALF.	85

RESUMO

SILVA, D. J. Tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios em reatores anaeróbios e em sistema de reatores combinados, enzimático-biológico. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

Este trabalho teve por objetivo investigar a degradação de lipídios em três sistemas anaeróbios de tratamento: um reator anaeróbio de fluxo horizontal de leito fixo (RAHLF), um sistema combinado composto por um reator enzimático de leito expandido invertido (RELI) seguido por um RAHLF e um reator anaeróbio de manta de lodo (UASB). Os sistemas foram monitorados em uma câmara com temperatura controlada a $30,0 \pm 0,5$ °C e alimentados com substrato sintético a base de lipídios, com concentração, em termos de demanda química de oxigênio (DQO) de $8\,748 \pm 711$ mg/L e concentração de óleos e graxas de 1820 ± 512 mg/L. O reator RAHLF foi operado com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 24 horas por 100 dias e apresentou eficiências médias de remoção de DQO e de lipídios de $98,9 \pm 0,4\%$ e $94,9 \pm 3,2\%$, respectivamente. O sistema combinado (reator enzimático / reator anaeróbio) apresentou eficiências médias de remoção de DQO e de lipídios de $99,0 \pm 0,3\%$ e $94,2 \pm 2,8\%$, respectivamente, operado com TDH de 30 min no reator enzimático e 24 h no reator microbiológico. Posteriormente, o reator RAHLF foi submetido à diminuição do TDH de 24 para 8 h. As eficiências médias de remoção de DQO e lipídios foram de $87,0 \pm 3,2\%$ e $90,5 \pm 2,7\%$ verificadas para o menor TDH aplicado (8 h). O modelo cinético baseado em reações paralelas e em série, de primeira ordem, indicaram que a velocidade de reação aumenta com o aumento da velocidade superficial no reator RAHLF. Este comportamento pode ser atribuído à diminuição contínua da resistência à transferência de massa da fase líquida. O reator UASB apresentou baixa eficiência devido à flotação de 85% da manta de lodo granular, após 18 dias de operação. Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o reator RAHLF pode ser utilizado como unidade única no tratamento de efluentes com alta concentração de lipídios, devido a ter apresentado performance similar à observada no sistema integrado enzimático-anaeróbio.

Palavras-chave: Tratamento anaeróbio de efluente, reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), sistema combinado enzimático-biológico, lipídios, óleos e graxas.

ABSTRACT

SILVA, D. J. (2004). Lipid-Rich Concentration Wastewater Treatment in Anaerobic Reactors in a Combined Enzymatic-Biologic Reactors System. PhD. Thesis – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

The aim of this work was the investigation of the lipid degradation in three anaerobic treatment systems: a horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor, a combined system composed by an inverted expanded-bed enzymatic reactor (EIBE) followed by a HAIB reactor and an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. The systems were monitored in a chamber under controlled temperature of 30 ± 0.5 °C and fed with lipid-based synthetic wastewater, with chemical oxygen demand (COD) of 8748 ± 711 mg/L and 1820 ± 512 mg/L of oil and grease concentration. The HAIB reactor was operated with hydraulic detention time (HDT) of 24 hours for 100 days and it presented average COD and lipids removal efficiencies of $98.9 \pm 0.4\%$ and $94.9 \pm 3.2\%$, respectively. The combined system (enzymatic/anaerobic reactors) presented COD and lipids removal efficiencies of $99.0 \pm 0.3\%$ and $94.2 \pm 2.8\%$, respectively, operating with a HDT of 30 min in the enzymatic reactor and 24 h in the microbiological one. Afterwards, the HAIB reactor was subjected to decreasing HDT values from 24 to 8 h. Average COD and the lipids removal efficiencies of $87.04 \pm 3.2\%$ and $90.5 \pm 2.7\%$, respectively, were achieved for the lower HDT applied (8 h). A kinetic model, based on first-order series and parallel reactions, indicated that the lipids reaction rate increased as the liquid superficial velocity was increased in the HAIB reactor, since the liquid-phase mass transfer resistance decreased continuously. The UASB reactor presented a poor performance, presenting flotation of the 85% of the granular sludge bed after 18 days of operation. The results obtained in this work permit the potential indication of HAIB reactor as the sole unit to treat lipid-rich wastewater, since the performance of the HAIB reactor was similar to that observed for the integrated hydrolytic-anaerobic system.

Keywords: Wastewater anaerobic treatment, horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor, combined enzymatic-biological system, lipids, oils and greases.

1 INTRODUÇÃO

O controle e a minimização das fontes de poluição e encaminhamento dos resíduos gerados pelas indústrias e pelo homem são as duas soluções mais efetivas e concretas utilizadas para assegurar a qualidade do meio ambiente. Pesquisas sobre o tratamento de águas residuárias em sistemas que utilizam processo anaeróbio, passaram a ocupar posição de destaque a partir dos anos 70, alavancadas pela necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias com menor consumo de energia. Com a crise do petróleo, o processo aeróbio, até então em posição de evidência, tornou-se questionável por requerer grande consumo de energia para aeração dos sistemas, com conseqüente elevação nos custos de operação e manutenção do processo.

O Brasil ocupa uma posição de vanguarda, em nível mundial na utilização de processos anaeróbios, na aceitação e disseminação da tecnologia anaeróbia para o tratamento de esgoto sanitário. Segundo Andrade Neto e Campos (1999), as configurações de reatores anaeróbios disponíveis tecnologicamente no Brasil são: o decanto-digestor, o filtro anaeróbio, o reator de leito expandido ou fluidificado e a lagoa anaeróbia. Em relação ao quantitativo, o reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB), ocupa uma posição de destaque, com estimativa de mais de 300 unidades instaladas pelo país (CHERNICHARO et al. 1999).

O bom desempenho apresentado pelos reatores anaeróbios instalados em estações de tratamento de esgoto sanitário e em muitas indústrias nem sempre é reproduzido quando estes são empregados no tratamento de águas residuárias contendo lipídios em concentrações elevadas. Via de regra, a aplicação do processo anaeróbio no tratamento de águas residuárias industriais contendo lipídios torna-se um complicador para o processo. A presença de lipídios em águas residuárias pode gerar problemas de transferência de massa do meio líquido para os microrganismos. Como a maioria dos reatores anaeróbios emprega a biomassa imobilizada em suportes ou auto-imobilizada na forma de grânulos, o acúmulo de lipídios sobre a estrutura do biofilme pode dificultar o acesso dos microrganismos à matéria orgânica. Além disso, o acúmulo de óleos e graxas no reator pode causar problemas de entupimento e flotação de lodo,

levando, conseqüentemente, a baixas eficiências na remoção de matéria orgânica. A baixa velocidade de hidrólise desses compostos é outro problema que pode dificultar o tratamento.

Muitas indústrias produzem efluentes com quantitativos elevados de lipídios, tais como plantas de processamento de óleos vegetais, laticínios e frigoríficos. O número de pesquisas sobre digestão anaeróbia de lipídios semipurificados é muito pequeno. A maioria dos resultados foi obtida com substratos sintéticos ou águas residuárias complexas, contendo outras substâncias como carboidratos e proteínas. Ainda que tais estudos forneçam passos para a possibilidade de tratamento anaeróbio de diferentes tipos de águas residuárias industriais ricas em lipídios, eles não permitem a avaliação de condições limites ou fornecem o discernimento do destino dos lipídios durante o tratamento (PETRUY E LETTINGA, 1997).

O estudo para viabilização do tratamento anaeróbio de águas residuárias ricas em lipídios pode seguir dois caminhos principais: o desenvolvimento, análise e aplicação de novas configurações de reatores anaeróbios para essa finalidade e a proposta de sistemas combinados que incluam unidades de pré-tratamento de água residuária, com a finalidade de se evitar os efeitos adversos relatados em reatores anaeróbios. Nesse sentido, esse trabalho procurou seguir as duas abordagens principais para tentar contribuir para a solução do problema de tratamento anaeróbio de águas residuárias contendo altas concentrações de lipídios.

Foi avaliado o desempenho de uma nova configuração de reator contendo biomassa imobilizada, o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), para o tratamento de água residuária rica em lipídios. Esta configuração de reator foi desenvolvida pelo grupo de Processos Anaeróbios da Escola de Engenharia de São Carlos - USP (ZAIAT et al., 1994) e avaliado para o tratamento de diversas águas residuárias. O desempenho do RAHLF precedido por reator enzimático, contendo lipase imobilizada, também foi avaliado, seguindo a abordagem de utilização de pré-tratamento como forma de melhorar, ou mesmo viabilizar, a tratabilidade de lipídios em reatores anaeróbios. O tratamento enzimático precedendo reatores anaeróbios tem sido empregado na literatura com resultados promissores (CAMMAROTA et al., 2001; LEAL et al., 2002; MODOLO, 2002).

Adicionalmente, um reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB), configuração já empregada em escala plena no tratamento de águas residuárias contendo

lipídios, foi operado em condições similares às do RAHLF para que uma comparação entre configurações em desenvolvimento e consolidadas fosse possível.

2 . OBJETIVOS

2.1 . OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do projeto de pesquisa foi avaliar o desempenho do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) aplicado ao tratamento de água residuária contendo alta concentração de lipídios e comparar os resultados obtidos com os apresentados por dois outros sistemas de tratamento: um reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) e um sistema combinado composto por um Reator Enzimático de Leito Expandido Invertido (RELI) seguido de um RAHLF.

2.2 . OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do projeto foram:

- Definir a metodologia de imobilização da enzima lipase.
- Determinar a melhor relação entre massa de suporte e concentração de solução enzimática disponibilizada para imobilização.
- Determinar a atividade hidrolítica da enzima.
- Verificar a viabilidade técnica, do uso de um Reator Enzimático de Leito Expandido Invertido, operando no pré-tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios.
- Comparar o desempenho do sistema de biorreatores combinados (RELI + RAHLF) com um RAHLF operado como controle.
- Comparar o desempenho de um RAHLF com uma configuração estabelecida de reator anaeróbio (UASB).
- Investigar a influência da variável tempo de detenção hidráulica (TDH) na eficiência do RAHLF.
- Quantificar e caracterizar dos microrganismos anaeróbios presentes no RAHLF.
- Analisar estrutura e diversidade microbianas presentes no RAHLF.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROCESSO ANAERÓBIO APLICADO AO TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

A digestão anaeróbia é um processo de degradação sucessiva da matéria orgânica na ausência de oxigênio molecular, que ocorre por ação de uma complexa comunidade de populações microbianas de características fisiológicas distintas, que atuam de forma sinérgica. Trata-se de uma cadeia alimentar onde o produto formado por uma população, no metabolismo para aquisição de energia, é o substrato para uma outra, e cuja etapa terminal se caracteriza pela produção de uma mistura de gases composta por metano e CO₂, principalmente. Essa mistura gasosa é geralmente denominada de biogás (HARPER e POHLAND, 1986; SPEECE, 1996; CRAVEIRO, 1994).

Dentre os processos de tratamento biológico, a digestão anaeróbia tem se destacado com grande potencialidade de aplicação. A maioria dos resíduos sólidos e líquidos agrícolas, urbanos e industriais presta-se como substratos à digestão anaeróbia, sendo facilmente adaptados para o tratamento, produzindo mínimas quantidades de lodo residual e gerando gás combustível de significativo valor comercial, muitas vezes passível de ser utilizado dentro do próprio processo fabril (MOTTA, 1985).

Durante muito tempo considerou-se que, na conversão anaeróbia de substâncias orgânicas em CO₂ e CH₄, participavam apenas 2 grupos de bactérias. Primeiramente a matéria orgânica, era fracionada e fermentada a ácidos pelas bactérias fermentativas e na segunda etapa os ácidos orgânicos eram degradados pelas archeas metanogênicas.

Pesquisas posteriores levaram a evidências de que os microrganismos metanogênicos não catabolizam ácidos orgânicos, exceto o fórmico e o acético, ficando, assim, caracterizada a existência de bactérias capazes de transformar alguns ácidos graxos de cadeias mais longas, compostos aromáticos e álcoois em acetato, CO₂ e H₂, bactérias estas denominadas acetogênicas. Outra via de formação de acetato seria a realizada pelos microrganismos denominados homoacetogênicos, os quais a partir do CO₂ e H₂, seriam capazes de gerar acetato. Verifica-se também, que rendimentos

superiores na produção de metano são obtidos quando este tem origem na conversão do acetato, realizado pelas metanogênicas acetoclásticas.

De acordo com Harper e Pohland (1986), o processo anaeróbio pode ser dividido em nove etapas, cada qual mediada por um grupo de microrganismos, a saber:

- Hidrólise de polímeros orgânicos complexos a monômeros como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos.
- Conversão de monômeros orgânicos a hidrogênio, bicarbonato, ácido acético, ácido propiônico, etanol e ácido láctico.
- Oxidação de compostos orgânicos reduzidos a hidrogênio, bicarbonato e ácido acético.
- Respiração homoacetogênica do bicarbonato pelas bactérias homoacetogênicas, formando acetato.
- Oxidação de compostos orgânicos reduzidos pelas bactérias redutoras de nitrato e pelas bactérias redutoras de sulfato.
- Oxidação do acetato a bicarbonato.
- Oxidação de hidrogênio.
- Fermentação acetoclástica pelas archeas metanogênicas, formando metano.
- Oxidação do hidrogênio, através da redução do bicarbonato, pelas archeas metanogênicas hidrogenotróficas.

A efetividade da degradação anaeróbia da matéria orgânica complexa depende da atividade metabólica simbiótica entre populações microbianas metabolicamente distintas, o que, assim, assegura a estabilidade do processo combinado com a biodigestão coordenada.

As diversas características favoráveis dos sistemas anaeróbios com células imobilizadas, passíveis de serem operados com elevados tempos de retenção de sólidos e baixos tempos de detenção hidráulica, conferem aos mesmos um grande potencial para a sua aplicabilidade em tratamentos de águas residuárias. São, geralmente, tecnologias simples e de baixo custo, com algumas vantagens quanto à operação e à manutenção (VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994; CHERNICHARO, 1997).

Pode-se listar como vantagens dos processos anaeróbios (METCALF e EDDY, 1991; VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994; CHERNICHARO, 1997; FORESTI et al., 1999):

- Baixo consumo de energia

- Menor produção de lodo de excesso (se comparado aos processos aeróbios), com conseqüente economia em relação a manejo e destino final dos resíduos dos sistemas de tratamento.
- Baixa demanda de área.
- Produção de metano, um gás combustível de elevado teor calorífico.
- Possibilidade de preservação da biomassa, sem alimentação do reator por vários meses (importante para efluentes sazonais).
- Tolerância a elevadas cargas orgânicas.
- Possibilidade de aplicação em pequena e grande escala.
- Baixo consumo de nutrientes.

Porém, algumas características desfavoráveis dos processos anaeróbios podem ser enumeradas (METCALF e EDDY, 1991; VAN HAANDEL e LETTINGA, 1994; CHERNICHARO, 1997; FORESTI et al., 1999):

- Sensibilidade do processo a mudanças das condições ambientais, como pH, temperatura, e sobrecargas orgânicas e hidráulicas.
- Longo período de partida do sistema, na falta inóculo adequado.
- Usual necessidade de aplicação de alguma forma de pós-tratamento.
- Possibilidade de geração de odores ofensivos, porém controláveis.
- Possibilidade de geração de efluente com aspecto desagradável.
- Remoção insatisfatória de nitrogênio, fósforo e patogênicos.

3.2 ENZIMAS

LEHNINGER (2002) define enzimas como biomoléculas, sejam proteínas ou ácidos ribonucléicos (RNAs), que catalisam reações químicas específicas. As enzimas não afetam o equilíbrio da reação catalisada, mas, aumentam a velocidade de uma reação catalisada fornecendo uma via de reação com uma menor energia de ativação. Funcionam em soluções aquosas diluídas em condições muito suaves de temperatura e pH. Elas são as unidades funcionais do metabolismo celular, as quais, atuando em seqüências organizadas, catalisam centenas de reações em etapas através das quais moléculas de nutrientes são degradadas, energia química é conservada e transformada, e as macromoléculas celulares são formadas a partir de precursores simples.

Segundo Bailey e Ollis (1986), enzimas são catalisadores biológicos, formados por proteínas que participam nas reações metabólicas de todos os organismos vivos.

Atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, reduzindo a energia de ativação da reação. Como a enzima não é consumida na reação, sua ação catalítica é semelhante à dos catalisadores inorgânicos. O que as distingue de um catalisador sintético (químico) comum, é a sua capacidade de catalisar uma reação sob condições suaves, como em soluções aquosas e em temperatura e pressão normais, com conseqüente diminuição do risco de desnaturação térmica dos compostos termolábeis, além da redução das necessidades energéticas e dos efeitos corrosivos (DIXON e WEBB, 1979; CONN e STUMPF, 1984).

Uma grande vantagem das enzimas sobre os catalisadores químicos é a sua alta especificidade ao substrato, o que leva a um rendimento maior na reação e uma baixa formação de subprodutos. No entanto, as relações de temperatura e pH, e a separação catalisador/produto são difíceis e dispendiosas. Além da quantidade de enzima presente, existem vários fatores que influenciam a atividade enzimática. Os principais são, segundo Moraes e Zanin (1985) e Silva (1998):

pH: pelo fato das enzimas serem proteínas, o caráter iônico dos grupos amino e carboxílico da proteína é afetado pelas mudanças de pH. Valores altos ou baixos de pH podem causar a desnaturação e, às vezes, até a completa inativação da enzima;

Temperatura: a reação enzimática é sensível à mudança de temperatura. Devido à natureza protéica de uma enzima, aumentando-se a temperatura ocorrerá uma desnaturação térmica, com conseqüente redução da concentração efetiva, implicando no decréscimo da velocidade de reação;

Concentração do substrato e enzima: a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima depende diretamente da concentração desta. Se a concentração do reagente ou substrato é aumentada, mantendo-se fixa a concentração da enzima e as demais condições, observa-se que a atividade enzimática atinge um máximo, além do qual não se tem efeito adicional mesmo quando se aumenta a concentração do substrato;

Concentração de co-enzimas presentes: certas substâncias são capazes de ativar as reações enzimáticas. Esta ativação pode ser resultado da ação de um íon inorgânico como K^+ ou Na^+ , sobre a velocidade de reação.

Concentração de qualquer inibidor presente: ao contrário dos ativadores, o efeito dos inibidores é diminuir a velocidade de reação.

3.2.1 Enzimas Imobilizadas

Enzimas imobilizadas são “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região definida do espaço com retenção de sua atividade catalítica, e que podem ser usadas repetida e continuamente” (CHIBATA, 1978).

Visando reunir as vantagens das enzimas sobre os catalisadores químicos comuns e a facilidade de separação dos catalisadores inorgânicos heterogêneos, técnicas de imobilização de enzimas vêm sendo desenvolvidas, para que permaneçam em uma forma insolúvel ao substrato.

Com a imobilização, obtêm-se catalisadores de alta especificidade ao substrato, e que, no final do processo, são facilmente separados do produto, simplificando as etapas de purificação e resultando na redução dos custos envolvidos no processo (CHIBATA, 1978; BAILEY e OLLIS, 1986).

As enzimas imobilizadas apresentam uma série de características específicas que tornam sua aplicação mais promissora em relação às enzimas solúveis. As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são o não desperdício de enzimas, a eliminação da etapa de purificação do produto, a capacidade de operação contínua do processo, a redução dos volumes de reação e a facilidade de controle do processo (ZANIN, 1989).

Os principais parâmetros de um sistema de enzima imobilizada são: a enzima, o suporte e a forma de ligação da enzima ao suporte. Como parâmetros adicionais que contribuem para o melhor desempenho da enzima, e que devem ser levados em consideração na avaliação do sistema, têm-se: pH, temperatura, força iônica, pressão, agitação, liberação de cofatores e liberação do substrato com a remoção dos produtos. Estes fatores influem no desempenho do suporte e, portanto, afetam o comportamento da enzima (ZANIN, 1989).

De todos os fatores supracitados, a maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte. Se, de um lado, um suporte criteriosamente selecionado pode aumentar o tempo de meia-vida da enzima imobilizada, de outro, uma escolha imprudente pode afetar adversamente não só o tempo de meia-vida, mas o desempenho global do sistema. Disto conclui-se que não há um suporte universal aplicável para todas as situações, havendo casos em que um suporte pode não ser eficiente para um dado processo, mas pode ser, no entanto, a melhor opção para outro.

Na seleção de um suporte, para uma determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como, aquelas relativas à possibilidade de regeneração do material. As principais propriedades que devem ser analisadas, segundo Zanin (1989), são as contribuições da superfície do suporte, tais como os micro-efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos), e a possibilidade de adsorver ou acumular outras substâncias além da enzima; morfologia; composição; resistência ao ataque microbiológico; resistência mecânica; e a resistência à compactação em operações a altas vazões em processos com reatores de leito fixo.

Os suportes podem ser classificados conforme sua morfologia e composição. A Figura 3.1 apresenta a classificação dos suportes de acordo com sua composição.

A morfologia do suporte, no que concerne à área superficial e ao diâmetro dos poros, é extremamente importante. De acordo com a morfologia, os suportes são classificados em porosos, não-porosos e estrutura de gel.

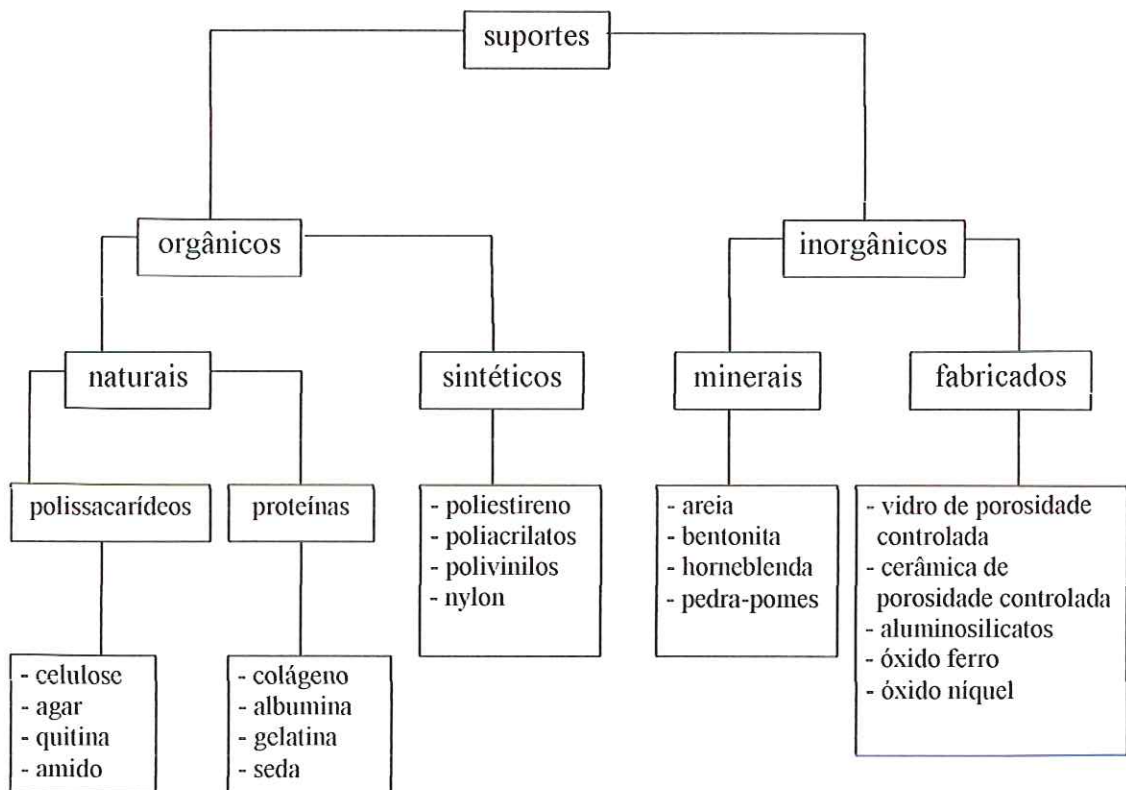


Figura 3.1: Classificação dos suportes de acordo com a composição química

Fonte: Moraes e Zanin (1985)

3.2.2 Seleção do Suporte e do Método para a Imobilização de Enzimas

Quando as enzimas são imobilizadas em suportes, deve-se levar em consideração, além destes, o método de imobilização, pois a quantidade de enzima e a atividade após a imobilização são funções do suporte e da enzima (ZANIN, 1989).

Na seleção de um suporte para a imobilização de uma enzima devem ser considerados o tamanho da partícula, a área superficial, a razão molar dos grupos hidrofílicos, e a composição química.

De um modo geral, o acréscimo da razão de grupos hidrofílicos e da área superficial aumentam a quantidade de enzima ligada por unidade de suporte, resultando em maior atividade da enzima imobilizada (CHIBATA, 1978).

Na otimização de um suporte para uma aplicação específica devem ser feitas algumas considerações. A primeira é conhecer a natureza catalítica da enzima, bem como as considerações para sua performance ótima, pois destas depende o sucesso do suporte escolhido. Em relação ao tipo de suporte, deve-se conhecer a configuração de reator que será utilizada.

Segundo Zanin (1989), deve-se conhecer, com relação à enzima, os fatores: massa molecular e característica físico química; condições experimentais ótimas para que se tenha máxima atividade catalítica com relação à escolha do sistema tampão, pH da alimentação, concentração do substrato, e íons ativadores; temperatura limite máxima da enzima solúvel e imobilizada; íons ou outros compostos que atuam como inibidores para a enzima; tipos de materiais em que a enzima pode ser ligada; técnica de imobilização que será utilizada; e condições em que a enzima imobilizada será utilizada.

Para auxiliar na seleção do suporte com as melhores condições possíveis, Zanin (1989) cita como fatores principais, o conhecimento da morfologia porosa do material; a possibilidade de imobilização da enzima neste suporte; a resistência do suporte a meios com diferentes valores de pH; a facilidade de manuseio do material; a resistência compressiva adequada; a máxima carga enzimática do sistema; a queda de pressão permissível no sistema, relacionando o tamanho e a forma da partícula e a vazão; o tempo de meia-vida operacional do sistema em função da temperatura, do pH e de outras condições; as condições de estocagem; e o valor econômico do sistema de enzima imobilizada.

3.2.3 Classificação e Comparação entre os Diferentes Métodos de Imobilização de Enzimas

São vários os métodos de imobilização de enzimas, cuja aplicação depende da solubilidade da enzima. Dinelli e Morisi (1974) e Cabral (1982), classificam esses métodos de acordo com a Figura 3.2.

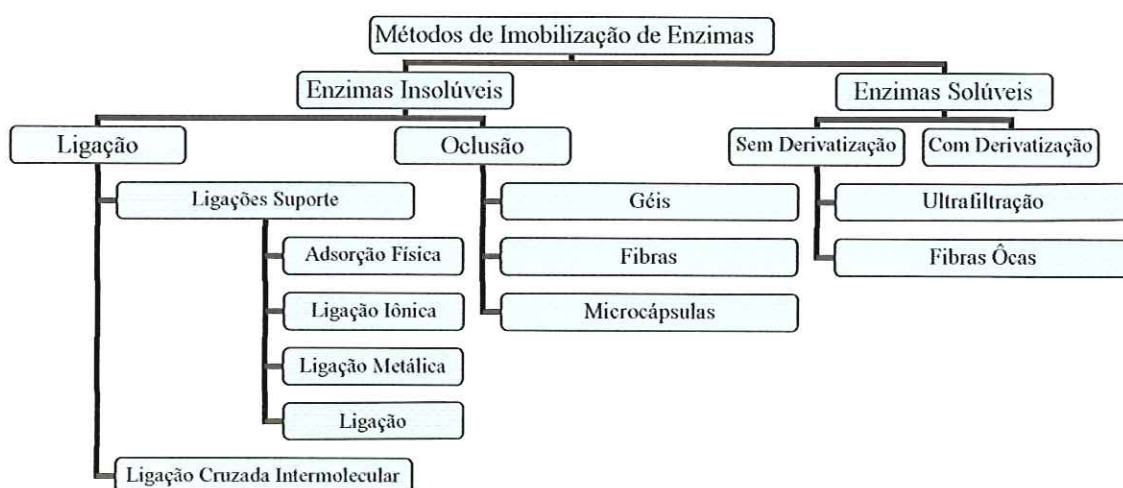


Figura 3.2: Classificação dos métodos de imobilização de enzimas

Fonte: Dinelli e Morisi (1974); Cabral (1982)

A Tabela 3.1 adaptada de Bailey e Ollis (1986), ilustra de forma resumida características importantes de diferentes técnicas de imobilização.

Tabela 3.1: Comparação entre as características de diferentes métodos de imobilização de enzimas.

Característica	Método de Ligação com o Suporte				
	Adsorção Física	Ligação Iônica	Ligação Covalente	Ligação Cruzada	Oclusão
Preparação	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Atividade Enzimática	Baixa	Alta	Alta	Intermediária	Alta
Especificidade ao Substrato	Invariável	Invariável	Variável	Variável	Invariável
Força de Ligação	Fraca	Intermediária	Forte	Forte	Forte
Regeneração	Possível	Possível	Impossível	Impossível	Impossível
Aplicabilidade geral	Baixa	Intermediária	Intermediária	Baixa	Alta
Custo de Imobilização	Baixo	Baixo	Alto	Intermediário	Baixo

Fonte: Bailey e Ollis (1986)

3.2.4 Lipases

As lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas classificadas como hidrolases, as quais atuam sobre a ligação éster de determinados compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos (JAEGER e REETZ, 1998). São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes microbianas, animais e vegetais (KAZLAUSKAS e BORNSCHEUER, 1998).

A ação das lipases se dá nas interfaces das moléculas e requer uma ativação interfacial (sítios ativos) para que possa ocorrer a total performance da atividade catalítica, fato este inicialmente estabelecido em 1958 por Sarda e Desnuelle. Entretanto, várias teorias têm sido postuladas sobre a atividade da lipase nas proximidades da formação de uma interface ativada. Em relatório desenvolvido pelos programas BRIDGE (EC) e NORDIC, ficou estabelecido que toda lipase parte originalmente de uma seqüência homóloga, incluindo regiões significativas, e o resíduo da serina no sítio ativo é protegido por uma membrana helicoidal que se abre no momento de contato entre a lipase e a interface, conduzindo à reestruturação da enzima (criando uma região eletrofílica ao redor do resíduo da serina), aumentando, assim, a afinidade do complexo por substratos de lipídios e estabilizando o estado de transição durante a catálise (BALCÃO et al., 1996).

O requerimento da lipase por uma interface é um ponto crítico da reação, embora o uso de um solvente hidrofóbico resulte em poucos locais de combinação de fluido (água remanescente) com a estrutura entrelaçada da lipase, a presença desta combinação nos arredores do sítio ativo pode preparar o local da interface necessária para ocorrer a ativação da enzima.

Além de hidrolisar naturalmente cadeias de ésteres e gliceróis, a lipase também é capaz de catalisar reações reversas sob condições aquosas e formar cadeias de ésteres entre álcool e ácido carboxílico. Estes dois processos podem ser combinados em seqüências típicas, originando reações denominadas interesterificação. Dependendo do ponto específico da reação no substrato, pode ocorrer a acidólise, a alcoolise e a transesterificação.

As lipases são capazes de produzir uma ampla variedade de produtos com alto potencial de pureza devido à sua especificidade ao substrato. Por envolver baixas energias de ativação, são vistas vantagens na utilização de lipases, tais como condições suaves de temperatura e pH nas reações, as quais conduzem a menor consumo de

energia e a diminuição nos danos causados pela temperatura nos produtos e nos reagentes.

A capacidade das lipases de realizar a hidrólise parcial de gorduras animais tem sido estudada primeiramente na produção de gêneros alimentícios. Processos para a produção de aromas de queijo e manteiga, através das lipases, são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, sendo que na forma imobilizada oferece maior número de vantagens por possibilitar o desenvolvimento de um processo contínuo de produção (GARCIA et al., 1992).

Garcia et al. (1992) estudaram a cinética da hidrólise da gordura de leite catalisada pela lipase (*Candida Rugosa*) imobilizada em um reator de fluxo axial, como o definido por Bakken et al. (1990). No referido trabalho, foram verificadas as diversas vantagens do uso da lipase imobilizada, no tipo de reator citado, na hidrólise da gordura de leite. O sistema utilizado indica potencial aplicação em indústrias, bem como apresenta outras vantagens derivadas do emprego da lipase imobilizada, havendo melhor controle da operação, alta produtividade por unidade de lipase e baixa inativação da enzima. Outra vantagem observada é que o reator pode ser recarregado várias vezes, quando a técnica utilizada para a sua limpeza for adequada.

3.2.5 Imobilização de Lipases

O uso da lipase imobilizada é vantajoso em relação ao de sua forma livre pois pode ser facilmente retida no reator, proporcionando a extensão da sua vida útil no sistema e prevenindo a contaminação dos produtos.

Por lipase imobilizada considera-se aquela localizada numa região definida do espaço, envolvida por uma “barreira” de material que permite a separação física da enzima do corpo volumoso da reação, tornando-a permeável às moléculas do reagente e do produto (BALCÃO et al., 1996).

A separação de uma lipase imobilizada pode ser ativada pela condução do seu micro ou macro-ambiente, por meio de ligações covalentes, adsorção (micro-ambiente) ou pela modificação do meio de reação usando um solvente orgânico (macro-ambiente). Toda imobilização envolvendo a lipase necessita de um ou mais agentes imobilizantes, que podem ser: forças covalentes, forças iônicas, pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, podendo, ainda, incluir um material ligante (BALCÃO et al., 1996; PEREIRA, 1999).

Segundo Ivanov et al. (1997), o uso da lipase em escala industrial requer a sua forma imobilizada e um método que possibilite o seu reuso tornando-o, assim, economicamente viável. No entanto, enquanto várias técnicas e materiais vêm sendo empregados para a imobilização de lipases, poucos estudos e comparações sistemáticos foram realizados em relação à atividade e à estabilidade operacional resultantes da ação da enzima como catalisadora em reações de hidrólise. Devido à ampla variedade de substratos, materiais suportes e enzimas empregadas nos sistemas imobilizados, grande quantidade de dados são gerados, os quais não podem ser diretamente comparados tornando extremamente difícil a escolha da melhor técnica a ser utilizada.

O comportamento de equilíbrio enzima/suporte em sistemas de imobilização depende de propriedades físicas e estruturais do suporte e de propriedades físicas e químicas da enzima. O polipropileno mostra consideráveis capacidades de adsorção para vários tipos de lipases, sendo este sistema lipase/polipropileno o mais relatado na literatura (Al-DURI e YONG, 2000).

A Tabela 3.2 referencia alguns trabalhos que vêm sendo desenvolvidos sobre a utilização de reatores empregando lipases imobilizadas.

Tabela 3.2: Principais características de reatores empregando lipases imobilizadas.

REAÇÃO [SOLVENTE(S)]	SUBSTRATO	CONFIGURAÇÃO (TIPO) DE REATOR	FONTE DE LIPASE	MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO	AGENTES DE LIGAÇÃO	SUPORTE	AUTOR/ANO
Hidrólise	Manteiga e água	BSTR	<i>Aspergillus niger</i>	Precipitação	E-(vdw)-E		Garcia et al., 1991
Hidrólise	Manteiga e água	FSMR	<i>Aspergillus niger</i>	Adsorção	C-(vdw)-E	Polipropileno	Malcata et al., 1992
Hidrólise	Óleo de oliva gordura de leite gordura de leite e água	CSTR	<i>Rhizopus delemar</i>	Encapsulamento	C-(vdw)-E	BSP Poliuretano	Chen e McGill, 1992
Hidrólise	Gordura de leite e água	BSTR	<i>Candida cylindracea , Rhizopus delemar</i>	Encapsulamento	C-(cf)-C	ENT, ENTP	Chen e Yang, 1992
Hidrólise	Gordura de leite e água	FSMR	<i>Candida rugosa</i>	Adsorção	C-(vdw)-E	Polipropileno	Garcia et al., 1992
Hidrólise	Manteiga e água	HFMR	<i>Aspergillus niger</i>	Adsorção	C-(vdw)-E	Polipropileno	Malcata et al., 1992
Hidrólise	Manteiga e água	HFMR	<i>Aspergillus niger</i>	Adsorção	C-(vdw)-E	Polipropileno	Malcata et al., 1993

Fonte: Adaptado de Balcão et.al (1996).

3.3 LIPÍDIOS

Por definição, lipídios são compostos solúveis em solventes apolares tais como benzeno, clorofórmio e éter, e praticamente insolúveis em água. (BAILEY e OLLIS, 1986).

Na literatura, encontram-se diferentes classificações de lipídios, dependendo do ponto de vista, químico ou biológico. De uma maneira geral, os lipídios podem ser divididos em dois grandes grupos: lipídios com ácidos graxos em sua composição, ou lipídios saponificáveis e lipídios que não contêm ácidos graxos ou lipídios insaponificáveis. Estes grupos podem ser subdivididos em:

Lipídios saponificáveis

- Glicerídeos: compostos por 1 a 3 moléculas de ácidos graxos esterificados ao glicerol, formando mono, di ou triglicerídeos.
- Ceras: ácidos graxos de 16 a 30 unidades de carbono e álcool mono-hidroxílico de 18 a 30 unidades de carbono.
- Fosfolipídios: ácidos graxos com fosfato.
- Esfingolipídios: ácidos graxos com esfingosina.
- Glicolipídios: ácidos graxos com glicerol e açúcares.

Lipídios insaponificáveis

- Terpenos: possuem unidades isoprenóides como unidades básicas. As vitaminas E e K são os principais exemplos
- Esteróides: o núcleo ciclopentano-per-hidro-fenantreno é a estrutura básica. Como exemplos citam-se o colesterol e a vitamina D.
- Carotenóides: é um tipo de terpeno, geralmente álcool. O exemplo mais importante é a vitamina A.
- Prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos: são eicosanóides derivados do ácido aracdônico.

De acordo com Lehninger (1990), as unidades fundamentais da maioria dos lipídios são os ácidos graxos. Define-se por ácidos graxos, ácidos orgânicos de cadeia longa, possuindo de 4 a 24 átomos de carbono e que possuem um único grupo carboxila e uma “cauda” hidrocarbonatada apolar, que confere à maioria dos lipídios a sua natureza oleosa e gordurosa, insolúvel em água. Ácidos graxos saturados de C12 a C24 são sólidos, apresentando uma consistência de cera. Ácidos graxos insaturados são líquidos oleosos à temperatura ambiente. Os lipídios mais simples e abundantes que

contêm ácidos graxos como unidades fundamentais são os triacilgliceróis, também chamados de gorduras, gorduras neutras ou triglicerídeos. Nas gorduras, predominam glicerídeos de ácidos saturados, por isso são sólidas à temperatura ambiente; nos óleos, predominam glicerídeos de ácidos insaturados, apresentando-se em forma de líquido nas mesmas condições.

Segundo Metcalf e Eddy (1992), o termo “lipídios” normalmente usado, inclui gorduras, óleos e graxas e outros constituintes similares encontrados em águas residuárias. Os lipídios são as misturas mais estáveis dos compostos orgânicos e apresentam dificuldades quando da decomposição por bactérias.

A presença de lipídios em águas residuárias pode causar muitos problemas nos coletores de esgoto e nas estações de tratamento. Caso os lipídios não sejam removidos antes do despejo do resíduo, eles podem interferir na vida biológica na superfície das águas e gerar filmes e materiais flutuantes pouco apresentáveis. Óleos e similares, derivados do petróleo, chegam em volume considerável aos esgotos, através de escoamentos provenientes de postos, garagens, lojas e águas pluviais das vias públicas. A maior parte é flotada nas águas residuárias formando uma camada superficial, interferindo na ação biológica e causando problemas de manutenção nas estações de tratamento.

3.4 REATORES ENZIMÁTICOS

De acordo com Moraes e Zanin (1985), o projeto e a operação de um reator preenchido com enzimas imobilizadas é o ponto mais crítico no emprego deste tipo de tecnologia. Segundo Zanin (1989), das inúmeras aplicações possíveis para as enzimas imobilizadas, sua utilização industrial é, presumivelmente, a mais importante e conseqüentemente a mais discutida.

As configurações de reatores mais utilizados em processos biotecnológicos contínuos com enzimas imobilizadas são: reator do tipo tanque agitado ou leito de lama; reator de leito fixo e reator de leito fluidificado. Outra configuração, com comportamento muito semelhante ao do leito fluidificado, é o de leito expandido, sendo a diferença básica entre os dois, o grau de expansão do leito de partículas (enzimas imobilizadas). Cada um dos referidos reatores é mais adequado para um tipo específico de suporte e tamanho de partícula, apresentando aspectos positivos e negativos quando

de uma determinada aplicação (McCABE, 1976; GOMIDE, 1983; COULSON et al., 1991).

No presente trabalho optou-se pela utilização do reator enzimático de leito expandido. A soma de aspectos positivos atribuídos a essa configuração (leito expandido ou fluidificado), apresenta vantagens quando da comparação com outras configurações previamente citadas.

Se em um reator que contém um leito de partículas sólidas, o fluido escoar no sentido vertical ascendente com pequena velocidade, as partículas repousam umas sobre as outras, como no reator de leito fixo. À medida que se aumenta a velocidade do fluido, atinge-se um ponto no qual a queda de pressão no leito multiplicada pela área transversal da coluna torna-se igual ao peso das partículas. Neste ponto, as partículas se separam lentamente e começam a se movimentar; é o início da fluidificação. O leito toma a aparência de um líquido em ebulição suave e apresenta propriedades características dos líquidos. Aumentando-se gradativamente a vazão do fluido, a separação das partículas torna-se mais pronunciada. Assim, o leito se expande e o movimento das partículas torna-se mais intenso. Atinge-se, então, uma vazão na qual as partículas são arrastadas com o fluido, determinando a velocidade terminal das partículas (McCABE, 1976; GOMIDE, 1983; COULSON et al., 1991).

A diferença de densidade entre o líquido e o sólido (para um mesmo tamanho de partículas) é um dos fatores importantes no desempenho dos reatores de leito expandido e fluidificado, pois à medida que esta é aumentada decresce a qualidade da fluidificação. Uma maior diferença de densidade entre o líquido e o sólido permite a utilização de maiores velocidades de fluidificação, sem que seja excedida a velocidade terminal das partículas. Isto permite o processamento de maior volume de reação em menor tempo. Porém, uma grande diferença entre as densidades tende a diminuir a qualidade de fluidificação devendo haver, portanto, um certo compromisso entre essas variáveis (McCABE, 1976; GOMIDE, 1983; COULSON et al., 1991).

As características de escoamento do fluido conduzem a um grau de mistura intermediário entre a mistura perfeita (reator contínuo agitado) e a mistura nula como no tubular. Os reatores de leito expandido e fluidificado são preferencialmente utilizados quando a solução de substrato é viscosa ou contém partículas em suspensão, pois possibilita a obtenção de conversão maior do que a obtida no reator contínuo com agitação, além de não apresentar os problemas de obstrução e alta perda de carga,

normalmente presentes no leito fixo (McCABE, 1976; GOMIDE, 1983; COULSON et al., 1991).

Além de reunir todas as vantagens do reator de leito fixo, os reatores de leito expandido e fluidificado apresentam uma série de outras peculiaridades à sua natureza, por exemplo, o fato das partículas de sólidos estarem em contínuo movimento promove uma distribuição de temperatura mais uniforme, além de favorecer a transferência de massa entre o fluido e a partícula (McCABE, 1976; GOMIDE, 1983; COULSON et al., 1991).

3.5 TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS CONTENDO LIPÍDIOS

A presença de óleos e graxas em águas residuárias torna necessária a implantação de unidades apropriadas para remoção destes compostos, uma vez que, como já citado, acarretam diversos problemas para as plantas em operação. Tais unidades compreendem processos físico-químicos, como a flotação, decantação, floculação ou filtração por membranas. A inserção de novas unidades onera os custos no tratamento e disposição de resíduos secundários gerados.

O impacto sofrido por sistemas aeróbios, relacionados à presença de óleos e graxas, é notado, principalmente, na transferência de oxigênio do meio para os flocos e da superfície para o líquido. Os sistemas anaeróbios, por sua vez, sofrem com a toxicidade apresentada quando da conversão das gorduras em ácidos graxos de cadeia longa, com os fenômenos de adsorção no meio granular e com a formação de escumas no topo dos reatores.

3.5.1 Efeitos da presença de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) na digestão anaeróbia

Os AGCLs são compostos com superfície ativa e, em meio aquoso, se comportam como surfactantes sintéticos. A sua forma não ionizada adsorve na célula microbiana e é então assimilada pela célula. Subseqüentemente, a acil-CoA sintase ativa os AGCLs que são então degradados com a remoção seqüencial de duas unidades

de carbono, chegando a acetato como produto final, isto é, através da β -oxidação (HWU E LETTINGA, 1997).

A degradação de AGCLs pode ser a etapa limitante na degradação anaeróbia de resíduos sólidos de esgoto sanitário, devido à baixa velocidade de crescimento de bactérias consumidoras de AGCLs, (ANGELIDAKI e AHRING, 1995; HWU e LETTINGA, 1997; SALMINEN e RINTALA, 2001). O acúmulo de AGCLs pode causar problemas na digestão anaeróbia por serem tóxicos aos microrganismos anaeróbios, principalmente aos acetogênicos e metanogênicos (GILBRAITH et al., 1971; HANAKI et al. 1981; RINZEMA et al., 1994; BROUGHTON et al, 1998; SALMINEN et al., 2000). A formação de espuma no topo dos reatores é outro problema identificado, ocasionado pelo acúmulo de ácidos graxos não biodegradados (SALMINEN e RINTALA, 2002).

Segundo Galbraith et al. (1997) e Hwu et al. (1998), a adsorção, função da concentração de lipídios no meio, pode ser considerada como um mecanismo de inibição, a qual depende de vários fatores, a saber:

- 1) Tipo de organismos presentes: microrganismos gram-positivos e metanogênicos são mais vulneráveis aos AGCL que os gram-negativos.
- 2) Área superficial específica de lodo: lodo suspenso é mais vulnerável que o lodo granular.
- 3) Comprimento da cadeia e saturação: maior inibição apresentada por AGCL com 12 a 14 carbonos e AGCL insaturados com 18 carbonos ou mais.

Substâncias como albumina, aminoácidos e cálcio podem reduzir a toxicidade dos AGCL. O cálcio presente no meio pode combinar e formar precipitados.

Trabalhos desenvolvidos por vários pesquisadores corroboram com os problemas identificados anteriormente.

Durante a realização de experimentos em batelada com substrato sintético, Hanaki et al. (1981) verificaram que a adição de AGCL resultou no aparecimento de uma fase lag na produção de metano a partir do acetato. Os autores verificaram, também, que a adição de CaCl_2 induzia a redução da inibição causada pelos AGCLs, desde que a cultura de microrganismos não fosse exposta por mais que algumas horas ao seu efeito tóxico. Os autores citam, também que a substituição do cloreto de cálcio por carbonato de cálcio pode não ser indicada pela baixa solubilidade deste último em água.

Os efeitos inibidores dos ácidos graxos de cadeia longa foram apresentados também no trabalho desenvolvido por Hwu e Lettinga (1997). Os resultados obtidos levaram à constatação do aumento da inibição da atividade metanogênica pelo oleato utilizado e de que a toxicidade do mesmo aumentava com o aumento da temperatura. Sendo assim, os microrganismos termofílicos apresentaram maior sensibilidade à presença de oleato que os mesofílicos. Hwu et al. (1996) verificaram, ainda, a proporcionalidade entre área superficial específica e toxicidade do oleato e puderam concluir que o lodo floculento e o lodo termofílico seriam mais suscetíveis à este composto. Hawkes et al. (1995) afirmam que a estabilidade do lodo granular é um dos maiores problemas das águas residuárias com alta concentração de lipídios.

Contrariamente aos resultados anteriores, Thomas (1987, apud BECKER et al., 1999¹) afirmou que o tratamento biológico de resíduos contendo lipídios em faixas termofílicas de temperatura poderia traduzir-se em benefícios para o sistema, uma vez que o aumento da temperatura provocaria o aumento da solubilidade da gordura e ácidos graxos de cadeia longa, tornando-os mais acessíveis aos microrganismos e suas enzimas lipolíticas, além de aumentar o coeficiente de difusão de substratos e produtos.

No trabalho de Alves et al. (1997), operando dois reatores de leito fixo para tratamento de águas residuárias de laticínios, foi constatado que, para cargas superiores a 9 g DQO/L.d, a maior quantidade de lipídios não afetou o desempenho do sistema, apenas reduziu a fração de biomassa aderida.

3.5.2 Estudos de Biodegradação de Águas Residuárias Contendo Lipídios

Muitas indústrias produzem efluentes com quantidades apreciáveis de lipídios, tais como: instalações de processamento de óleos vegetais; laticínios; abatedouros; e indústrias de processamento de carne (PETRUY e LETTINGA, 1997; BRAILE e CAVALCANTI, 1993). A produção industrial é acompanhada de enormes quantidades de efluentes que, conseqüentemente, conduzem a impactos ambientais (HWU et al., 1996).

¹ THOMAS, A. (1987). Fats and fatty oils. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. VCH. Weinheim, Germany

BECKER, P., KOSTER, D., POPOV, M.N., MARKOSSIAN, S., ANTRANIKIAN, G., MARKL, H. (1999) The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under thermophilic conditions. *Water Research*, v. 33, n. 03, pp.653-660.

Os óleos e graxas presentes em determinadas águas residuárias industriais dificultam o tratamento anaeróbio dos efluentes, podendo envolver os grânulos ou partículas de biomassa do reator, obstruindo o acesso dos microrganismos ao substrato, ocasionando, assim, problemas de entupimento no reator e baixa eficiência na remoção de matéria orgânica. A baixa velocidade de hidrólise desses tipos de compostos pode resultar em altos tempos de detenção hidráulica para que desempenho adequado seja atingido.

De acordo com Petruy e Lettinga (1997), o número de pesquisas sobre digestibilidade anaeróbia de lipídios é muito pequeno. A maioria dos resultados foi obtida com substratos sintéticos ou águas residuárias contendo outras substâncias além de lipídios, tais como carboidratos e proteínas. Ainda que tais estudos forneçam passos para a possibilidade de tratamento anaeróbio de diferentes tipos de águas residuárias industriais ricas em lipídios, eles não permitem a avaliação de condições limites, nem fornecem o discernimento do destino dos lipídios durante o tratamento.

Petruy e Lettinga (1997), relataram que, durante a operação de uma planta piloto alimentada com água residuária complexa de abatedouro, os lipídios acumulados formaram uma camada de espuma flutuante no topo do reator do tipo filtro anaeróbio, causando obstrução das linhas de gás e efluentes.

Rinzema et al. (1993) utilizaram um reator EGSB[®] (expanded granular sludge-bed) em escala de bancada, no tratamento de emulsões de lipídios. Os reatores foram equipados com dispositivos para separação das fases sólida e líquida, com finalidade de evitar a lavagem do lodo flotado. O principal problema ocorrido foi a flotação do lodo devido à baixa conversão de lipídios em metano. Em trabalho preliminar desenvolvido pelo mesmo pesquisador, o reator EGSB[®] já havia demonstrado maior eficiência em relação ao UASB convencional quando do tratamento de águas residuárias complexas à base de sais de sódio, ácido láurico e ácido capróico.

Em escala de laboratório ou escala real, a aplicação de reatores anaeróbios do tipo EGSB[®] no tratamento de efluentes ricos em lipídios tem causado flotação e remoção por lavagem do lodo granular (RINZEMA et al., 1993). BECKER et al. (1999) associam a formação de espuma em reatores à presença de actinomicetos filamentosos, como *Nocardia amarae*.

Hwu et al. (1998) operaram um reator UASB alimentado com ácido oléico e verificaram que a concentração tóxica dos AGCL foi muito superior aos valores de

concentração empregados que provocaram a flotação do lodo. Este fato, segundo os autores, tornaria a toxicidade um efeito secundário.

Vidal et al. (2000) realizaram ensaios em batelada de biodegradabilidade com duas diferentes razões proteínas:carboidratos:gorduras, visando simular as diferentes condições de efluentes de laticínios: 17,4:30,5:52,1 (%) e 34,2:62,8:3,0 (%). Os reatores foram inoculados com lodo de um UASB tratando água residuária rica em carboidratos. Os autores verificaram cinéticas de degradação diferentes em ambos os casos. Além disso, as águas residuárias correspondentes à primeira razão mostraram dois picos exponenciais, sendo o primeiro atribuído à degradação de açúcares e algumas proteínas e o segundo à degradação das gorduras. Para concentrações de matéria orgânica de 5 g/L, expressa como DQO, a biodegradabilidade e conversão a metano foram superiores para a primeira razão utilizada, e para valores maiores de DQO (5 a 20 g/L), a biodegradabilidade e conversão a metano diminuíram ainda mais para o segundo caso. Apesar dos intermediários formados, estes não alcançaram concentrações suficientes para provocar inibição aos diferentes grupos tróficos. Foi verificada a flotação de lodo nos reatores com menores concentrações de gorduras, fato justificado pela quantidade relativamente alta de carboidratos. A degradação desses compostos resultou em rápida produção de gases e na formação de polímeros extracelulares. Diante destas condições, os autores aconselharam a operação de reatores com cargas entre 3 e 5 kg DQO/m³ para assegurar maior biodegradabilidade e conversão a metano em ambos os casos e evitar problemas de flotação de lodo.

Petry e Lettinga (1997) avaliaram o comportamento de um reator EGSB[®], tratando água residuária com lipídios semi purificados (gordura de leite emulsificada). Os autores concluíram que a gordura de leite apresenta dificuldade de degradação nesta configuração de reator. Uma grande parte dos lipídios foi eliminada da fase líquida do reator, devido a fenômenos de adsorção. Cerca de 70% dos lipídios foram adsorvidos no lodo granular dentro de aproximadamente um dia. Os lipídios adsorvidos no lodo granular não foram degradados de forma significativa e o material coloidal que não foi adsorvido foi lentamente liquefeito.

Alves et al. (2001) estudaram a degradação de lipídios em reatores anaeróbios de leite fixo, variando a composição do substrato, iniciando com leite desnatado, passando por leite integral até oleato de sódio como única fonte de carbono. Conforme os autores, o oleato foi escolhido por ser o AGCL com maior concentração em águas residuárias, por apresentar boa solubilidade e por ser produzido na degradação do leite. Os autores

verificaram remoção acima de 90% da concentração de matéria orgânica medida como DQO, utilizando oleato de sódio como fonte única de carbono, à concentração de 12 g/L no afluente. Observou-se também que, no início da operação, quando o reator foi alimentado apenas com leite desnatado, o biofilme apresentou baixa espessura, sendo a mesma aumentada com a utilização do oleato como única fonte de carbono. O comportamento do biofilme do reator de controle, alimentado sem lipídios, foi o oposto, com redução da espessura do biofilme em 50% na alimentação utilizando oleato como única fonte de carbono.

O emprego de reatores tipo UASB tratando água residuária de uma indústria de óleo de girassol foi verificado por Saatci et al (2003). De acordo com os resultados apresentados, o reator foi capaz de reduzir a concentração de lipídios totais de aproximadamente 1600 mg/L para até 98 mg/L, aplicando-se uma carga 1,6 e 7,8 Kg DQO/m³.d e tempo de detenção hidráulica entre 2,0 e 2,8 dias. A conversão da DQO para metano variou entre 0,16 e 0,35 m³ CH₄/kg DQO, ou seja, conversões de 44 a 97% foram obtidas.

Rincon et al. (2003) testaram o emprego de reatores UASB no tratamento de águas residuárias de plantas de processamento de petróleo na Venezuela. Os autores verificaram que o sistema alcançou eficiência de até 87% na remoção de DQO, quando alimentado com baixas cargas de óleo leve, sendo a matéria orgânica remanescente de baixa degradabilidade ou não degradável. Para tempos de detenção hidráulica acima de 10 horas e carga maiores que 3 gDQO/L.d, lodo do reator flutuou. Este comportamento foi atribuído ao aumento da concentração de ácidos graxos voláteis, fato indicativo da sobrecarga da população metanogênica, e ao aumento da DQO, referente aos ácidos graxos não voláteis, indicando diminuição da capacidade de acidificação. As eficiências de remoção das frações mais pesadas de óleo foram baixas, sendo de 20 e 37% para as frações médias e pesadas, respectivamente, de modo que o lodo não apresentou adaptação a este substrato.

Gavala et al. (1999) consideraram viável o uso de reatores do tipo UASB, no tratamento de águas residuárias contendo óleos e graxas, desde que o afluente do sistema de tratamento seja previamente diluído, para evitar problemas de instabilidade e baixa eficiência.

3.6 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS CONTENDO LIPÍDIOS EM SISTEMAS COMBINADOS

A combinação de diferentes configurações de reatores, destinados ao tratamento de águas residuárias com elevadas concentrações de lipídios, visa a obtenção de melhores resultados no que tange respeito ao atendimento dos requisitos de qualidade do efluente. Geralmente a primeira das etapas envolve a hidrólise dos lipídios presentes nos resíduos, objetivando minimizar os problemas relacionados com este tipo de resíduo nas etapas subseqüentes (KASPAGIL et al., 1994; PERLE et al., 1995).

Omil et al. (2003) empregaram no tratamento de água residuária complexa contendo lipídios (proveniente de laticínios), um filtro anaeróbio seguido de um reator aeróbio operado em bateladas seqüenciais, em escala real. Segundo os autores, foi necessário a utilização de NaOH no tanque de alimentação do filtro anaeróbio, para correção do pH afluente, evitando assim problemas de instabilidade na primeira fase de operação. Desta forma, a concentração de óleos e graxas diminuiu de 1,8 g/L para 0,5 g/L, indicando a ocorrência de hidrólise, sendo que o efluente do reator apresentou concentração igual a 0,2 g/L. Após ter alcançado o estado estacionário, os valores de entrada e saída de concentração de óleos e graxas foi de 395 mg/L e 208 mg/L. Durante a operação do sistema anaeróbio, houve geração de ácidos graxos, que foram removidos na etapa aeróbia. A utilização de hidróxido de sódio é recomendada, pois, além de promover a hidrólise, neutraliza a acidez afluente e mantém a alcalinidade do meio (OMIL et al., 2003).

Beccari et al. (1998) realizaram experimentos em um sistema de dois reatores semi-contínuos em escala da bancada, alimentados com efluente de planta de processamento de azeite de oliva. Segundo os autores, a saturação de AGCLs insaturados é o fator chave para prevenir a inibição da metanogênese. A separação das fases acidogênicas e metanogênicas não foi completa no sistema desenvolvido, ocorrendo atividade metanogênica no primeiro reator. Neste sistema foi possível obter variações da biotransformação de AGCLs insaturadas em ácido palmítico no primeiro reator seguido de uma queda drástica da inibição na metanogênese no segundo reator.

Leal et al. (2002) associaram uma etapa de hidrólise lipídica empregando um extrato de lipase, obtido a partir da fermentação em estado sólido da cultura de *Penicilium restrictum*, ao tratamento anaeróbio. Neste trabalho, amostras de água

residuária de laticínio foram submetidas à hidrólise utilizando-se 10 e 20% v/v de extrato enzimático com atividade igual a 2,1 U.mL, por um período de 12 horas, a 35°C, sem agitação. Os autores empregaram concentrações de óleos e graxas iguais a 180; 450; 900 e 1200 mg/L. Amostras da água residuária hidrolisada e não hidrolisada foram tratadas anaerobiamente, em reatores em batelada contendo lodo adaptado, alimentado a cada quatro dias, sendo analisadas a DQO e o pH. Os resultados apontaram que, na água residuária sujeita ao pré-tratamento, a remoção de DQO foi até dez vezes superior à água não tratada, nas primeiras 24 horas, para a maior concentração. Para a concentração de 180 mg/L, a remoção alcançou 95% de eficiência para o substrato hidrolisado e 55% para o não hidrolisado. Os autores observaram, ainda, a importância do desenvolvimento de estudos em reatores anaeróbios contínuos e da minimização do uso de lipases, uma vez que os resultados obtidos mostraram a possibilidade de emprego desta tecnologia.

A utilização da pré-hidrólise como etapa anterior a um tratamento anaeróbio foi estudada por Cammarota et al. (2001). Os autores utilizaram um preparado enzimático obtido da cultura de *Penicillium restrictum* e misturaram à água residuária de laticínio por 12 horas, a 5% v/v. A água residuária foi separada por filtração e armazenada para aplicação em um reator UASB, sofrendo correção de pH. O reator UASB foi operado inicialmente, com taxa de carregamento orgânico média de 4 kg DQO/m³.d, sendo que a concentração de óleos e graxas foi gradualmente aumentada, até seu limite operacional. A partir deste ponto, o reator foi alimentado com a água residuária pré-hidrolisada, contendo os mesmos valores de óleos e graxas. No entanto, o reator apresentou concentração efluente deste compostos abaixo de 50 mg/L após 15 dias de operação. Os valores semelhantes de metano produzidos em ambos os estágios foi justificado pelo fato de a hidrólise facilitar a ação microbiana e reduzir o tempo da fase hidrolítica. Cabe ressaltar que, para valores elevados de concentração de óleos e graxas aplicados na primeira fase de operação, a produção de metano foi muito superior.

O emprego de diferentes pré-tratamentos das partículas de gorduras no esgoto sanitário foi estudado por Masse et al. (2001). Os autores empregaram hidróxido de sódio e três enzimas: a lipase pancreática (LP250), a lipase bacteriana e a lipase de plantas. Os resultados obtidos para a utilização do hidróxido de sódio em uma faixa de concentração entre 50 e 400 meq/L durante quatro horas não produziu efeitos significativos sobre a DQO solúvel, quando utilizadas concentrações de 3,0 g/L de gordura de porco. Porém, foi verificada a diminuição do tamanho das partículas em

cerca de 70%. A lipase pancreática apresentou, por sua vez, uma redução de diâmetro de partículas de cerca de 60%, sendo que partículas de gordura menores necessitaram maiores concentrações de lipases para alcançar eficiência semelhante. Os autores constataram que a lipase pancreática foi mais eficiente para gordura de carne bovina que para gordura de suíno, e atribuíram este resultado à menor quantidade de ácidos graxos poliinsaturados encontrada na gordura de carne bovina. A constatação da solubilização da lipase pancreática foi indicada pela liberação de AGCL. Segundo os autores, a DQO solúvel não foi um bom indicador da lipólise enzimática por causa da adsorção da enzima na partícula de gordura. A lipase pancreática apresentou, ainda, redução do diâmetro das partículas, mas apenas para doses superiores a 1000 mg/L ou elevados tempos de detenção hidráulica.

Kim et al. (2004) estudaram um sistema de duas fases, composto por um CSTR acidogênico e um UASB metanogênico para degradação de água residuária contendo lipídios. Os autores compararam os resultados com um UASB tratando água residuária sintética contendo AGCLs. A presença destes ácidos não provocou perturbações em ambos os sistemas para misturas superiores a 1,21 kg ácidos-DQO/m³.d, mas a eficiência do UASB simples foi afetada para taxas de carregamento superiores a 1,38 kg ácidos-DQO/m³.d. O sistema de duas fases foi capaz de eliminar mais de 19,2% de ácidos graxos de cadeia longa e 11,5% dos ácidos graxos de cadeia longa insaturados foram saturados na acidogênese. Este fato resultou em aumento da taxa de produção de metano e reduziu a camada de espuma do UASB subsequente.

3.7 REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO (RAHLF)

Objetivando desenvolver uma nova configuração de reator anaeróbio, Zaiat et al. (1994), apresentaram uma concepção e avaliação preliminar de desempenho do Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF). Neste projeto foi priorizada a observação de critérios racionais como estudos de transferência de massa nas fases líquida e sólida e cinética intrínseca e hidrodinâmica do reator, visando simulação, aumento de escala e otimização de reatores anaeróbios contendo biomassa imobilizada. Fundamentalmente, nessa nova configuração de reator, a biomassa é imobilizada em

meio suporte estacionário (espuma de poliuretano), sendo operado com fluxo horizontal, o que confere características de regime de fluxo de pistão (FORESTI et al., 1995).

Desde a concepção do RAHLF, vários estudos foram conduzidos com reatores em escala de bancada e piloto, alimentados com diferentes águas residuárias, e monitorados em diferentes condições de operação. Consta como estudos realizados com aplicação do RAHLF no tratamento de águas residuárias sintéticas: à base de glicose (ZAIAT et al. 1995); simulando esgoto sanitário (SARTI, 1998); com aumento progressivo na concentração de matéria orgânica e submetido a cargas de choque orgânicas (CABRAL 2000). Empregado no tratamento de xenobióticos o RAHLF foi avaliado em: degradação de pentaclorofenol (PCP) (DAMIANOVIC, 1997); degradação de fenol em condições mesofílicas (BOLAÑOS-ROJAS, 2001); avaliação da comunidade e atividade microbianas no RAHLF operado com PCP (BARALDI 2001); e na degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) (DE NARDI, 2002). Operado com variações na relação DQO/SO_4^{-2} foram desenvolvidos trabalhos de: avaliação do efeito da relação DQO/SO_4^{-2} no desempenho do RAHLF tratando substrato sintético (LOAIZA-CADAVID, 1997); avaliação da influência da relação DQO/SO_4^{-2} sobre os parâmetros cinéticos de consumo de substrato em biopartículas do RAHLF (VELA, 1999); e avaliação dos efeitos das relações DQO/SO_4^{-2} e das variações progressivas de sulfatos no desempenho do RAHLF (GALAVOTI, 2003). CABRAL (1995) realizou a caracterização hidrodinâmica do RAHLF, e De Nardi (1997) avaliou a influência das características do traçador nas curvas de distribuição de tempos de residência. No tratamento de águas residuárias industriais, o RAHLF foi avaliado com efluente de indústria de papel (FORESTI et al., 1995); e efluente de indústria de refrigerante (MORAES, 2002). Também empregou-se o RAHLF no tratamento de líquidos percolados de aterros sanitários (CONTRERA, 2003).

3.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A observação e entendimento dos problemas causados pela presença de lipídios em sistemas anaeróbios, demanda por estudos detalhados sobre o comportamento deste composto, observando critérios racionais e relacionando-os aos resultados empíricos. A utilização de uma configuração de reator anaeróbio (RAHLF), ainda não experimentado no tratamento de águas residuárias contendo lipídios, visa a obtenção de informações sobre o comportamento específico deste composto, visto que a maioria dos trabalhos

desenvolvidos nesta área, utiliza águas residuárias complexas, contendo outros substratos como proteínas e carboidratos, por exemplo.

Uma alternativa ainda não experimentada em escala plena é a utilização de sistemas combinados compostos por reatores enzimáticos seguidos de reatores biológicos. A literatura indica resultados promissores desses sistemas combinados, como forma de melhorar, ou mesmo viabilizar, a tratabilidade de lipídios, realizando uma pré-hidrólise antes da alimentação dos reatores anaeróbios.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO GERAL

A concepção teórica deste trabalho contemplou, como objetivo principal, avaliar o desempenho do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) aplicado ao tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios, e comparar os resultados obtidos com os apresentados por dois outros sistemas de tratamento: um reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) e um sistema combinado composto por um Reator Enzimático de Leito Expandido Invertido (RELI) seguido de um RAHLF. A aplicação de um sistema de biorreatores combinados foi estudada seguindo a abordagem de utilização de pré-tratamento, sendo esta alternativa de sistema apresentada na literatura com resultados promissores. Como estratégia de investigação, a fase experimental do projeto foi dividida em três etapas. As etapas e seus respectivos objetivos são apresentados na Tabela 4.1.

Na Etapa I foram desenvolvidos todos os procedimentos referentes à imobilização das enzimas e construção e caracterização dos reatores enzimáticos de leito expandido invertido e RAHLFs.

Na Etapa II foi realizada a operação e o monitoramento do RAHLF e do sistema combinado de biorreatores contínuos, enzimático-RAHLF.

Durante a Etapa III monitorou-se um reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) e investigou-se o comportamento do RAHLF, otimizando-se a variável tempo de detenção hidráulica (TDH).

Tabela 4.1: Etapas propostas para o estudo de tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios em reatores anaeróbios e em sistema combinado, enzimático biológico.

Etapa		Objetivos
I	Construção e caracterização dos reatores RELI e RAHLF	<ul style="list-style-type: none"> - Definição da metodologia de imobilização da enzima. - Determinação da melhor relação de massa de suporte/concentração de solução enzimática disponibilizada para imobilização. - Determinação da atividade hidrolítica. - Definição e caracterização da composição da água residuária com alta concentração de lipídios.
II	Operação e monitoramento do sistema de biorreatores contínuos - sistema combinado	<ul style="list-style-type: none"> - Verificação da viabilidade técnica, do uso de um RELI, operando no pré-tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios. - Comparação do desempenho do sistema de biorreatores combinados com um RAHLF operado como controle.
III	Operação e monitoramento de duas configurações de reatores anaeróbios (RAHLF e UASB) submetidos às mesmas condições de operação.	<ul style="list-style-type: none"> - Comparação do desempenho de um RAHLF com uma configuração estabelecida de reator anaeróbio. - Investigação da influência da variável tempo de detenção hidráulica (TDH) na eficiência do processo. - Quantificação e caracterização dos microrganismos anaeróbios presentes no RAHLF. - Análise da estrutura e da diversidade microbiana presentes no RAHLF.

4.2 ENZIMA

Enzimas imobilizadas podem ser encontradas no comércio especializado, as quais apresentam um valor de mercado muito elevado. A utilização de uma lipase comercial imobilizada poderia até resultar em uma atividade hidrolítica maior, porém, o custo destes catalisadores tornaria a sua aplicação na área de saneamento completamente inviável sob o aspecto econômico.

Uma das principais características de uma enzima, no contexto de hidrólise, é a sua especificidade ao substrato. Visando o desenvolvimento de um reator enzimático para tratar águas residuárias contendo lipídios de diferentes fontes, utilizou-se uma enzima com ampla faixa de especificidade ao substrato, a qual promove a hidrólise de óleos e gorduras de diferentes fontes, tais como as presentes em óleos vegetais, produtos lácteos e cosméticos (NOVO NORDISK, 2003).

A enzima utilizada nos experimentos foi a LIPOLASE 100L da NOVO NORDISK. Trata-se de uma lipase (EC 3.1.1.3) derivada do *Thermomyces lanuginosus*, produzida pela fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae* modificado geneticamente para obtenção de uma enzima capaz de hidrolisar óleos e gorduras de diferentes fontes. Esta enzima hidrolisa os lipídios quebrando as cadeias do éster nas posições 1 e 3 das moléculas de triglicerídeos, produzindo mono e diglicerídeos, glicerol e ácidos graxos livre (NOVO NORDISK, 2003).

A LIPOLASE 100L é um produto utilizado na formulação de sabões e detergentes comerciais para facilitar a remoção de gorduras e óleos. Conforme ficha técnica esta enzima apresenta atividade declarada de 100 KLU/g, determinada utilizando-se tributirum como substrato, temperatura igual a 30 °C e pH igual a 7,0.

4.3 SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

O material utilizado como suporte para a imobilização da enzima lipase foi o polietileno de baixa densidade. Com a denominação de PB 680/59, este suporte é produzido pela POLIOLEFINAS e micronizado pela SPP – AGAPRINT. Trata-se de uma resina produzida sob alta pressão em reator autoclave. Esta resina atende à regulamentação para polímeros de olefinas do 21 CFR, seção 177.1520, item C (2.1) da FDA – “FOOD AND DRUG ADMINISTRATION”, podendo ser utilizada inclusive em

aplicações de embalagem alimentar. Como especificações técnicas principais, apresenta granulometria de 35 mesh, densidade de $0,923 \pm 0,002 \text{ g/cm}^3$, e temperatura de amolecimento igual a $93 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4 BIOMASSA ANAERÓBIA – INÓCULO

O lodo anaeróbio utilizado como inóculo nos reatores foi obtido junto à Dacar Industrial S.A., localizada no município de Tietê. Trata-se de lodo granulado de reator anaeróbio do tipo manto de lodo de escoamento ascendente (UASB), utilizado no tratamento de efluentes de abatedouro de aves.

4.5 SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DO LODO ANAERÓBIO

Espuma de poliuretano, sem adição de corante, com densidade aparente de 23 kg/m^3 foi utilizada em forma de cubos com 5 mm de lado como suporte para imobilização da biomassa imobilizada. O diâmetro médio equivalente dos poros (alvéolo) do material foi de $543 \pm 154 \text{ } \mu\text{m}$ (CCDM/UFSCar - Certificado 02/003276 de 2 de julho de 2002)

4.6 REATOR ENZIMÁTICO DE LEITO EXPANDIDO INVERTIDO

O reator enzimático de leito expandido invertido (RELI), era constituído de uma coluna de acrílico equipada com distribuidores de fluxo nas extremidades, com 60 cm de altura e 2 cm de diâmetro interno, relação L/D de 30 e volume útil de 135 mL, sendo preenchido com 25 g de enzima imobilizada. Devido à baixa densidade do suporte utilizado na imobilização da enzima ($0,923 \pm 0,002 \text{ g/cm}^3$), a expansão das partículas (enzimas imobilizadas), foi realizada em fluxo descendente, por isso a denominação de RELI. A Figura 4.1 apresenta uma representação esquemática do RELI.

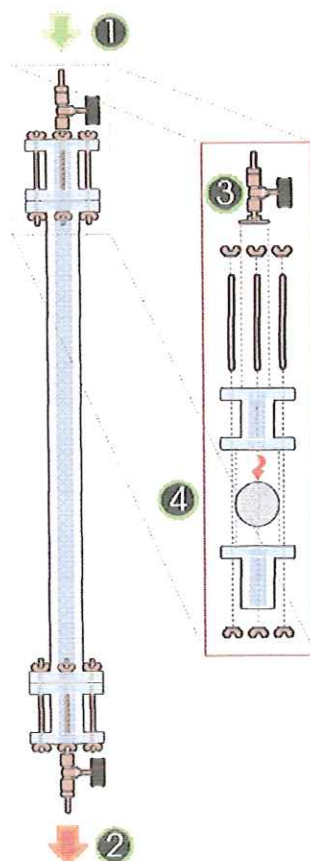


Figura 4.1: Reator enzimático de leito expandido invertido (RELI). 01 – Afluente; 02 – Efluente; 03 – Válvula agulha; 04 - Distribuidor de fluxo

4.7 REATOR UASB

Nos experimentos realizados durante a etapa III, utilizou-se um reator UASB. O referido reator foi construído em acrílico e aço inox, apresentando um volume total de 10,5L. A Figura 4.2 apresenta uma representação esquemática do reator. Acoplado ao reator, instalou-se um sistema de medida de produção de gases por deslocamento de líquido.

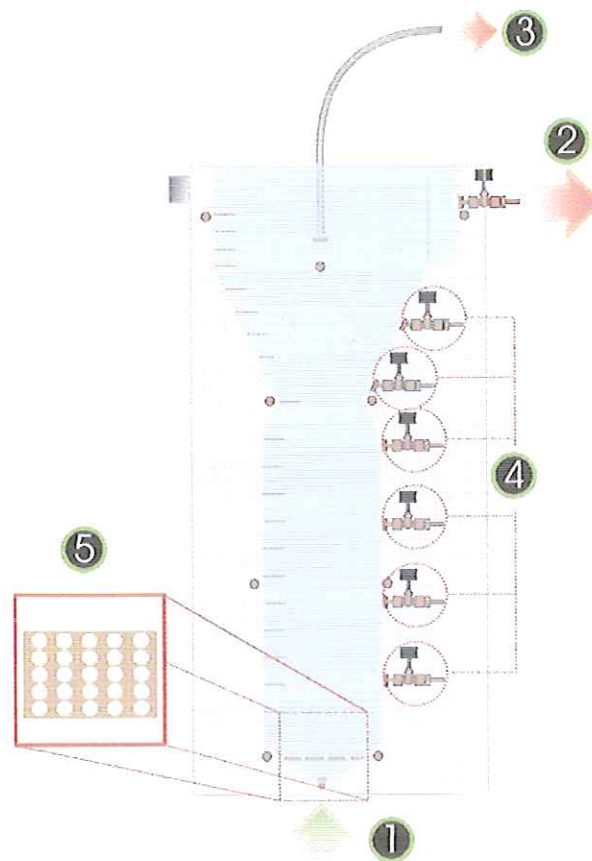


Figura 4.2: Reator UASB. 01 – Afluente; 02 – Efluente; 03 – Saída de gás;
4 – Coletores de amostra; 05 – Placa de distribuição de fluxo

4.8 REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO (RAHLF)

Em duas das três etapas realizadas neste trabalho, foram utilizados reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLFs), desenvolvidos desde 1994 no Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP (ZAIAT et al., 1997). Na etapa II, os experimentos foram realizados utilizando-se dois RAHLFs, um como parte integrante do sistema de reatores combinados e outro operado como controle, para comparação do desempenho desta configuração de reator, com e sem um pré-tratamento da água residuária contendo lipídios.

Nos experimentos da etapa III, utilizou-se o mesmo RAHLF operado como controle na etapa II, denominando de RAHLF₀₃. A Figura 4.3 apresenta a representação esquemática do referido reator.

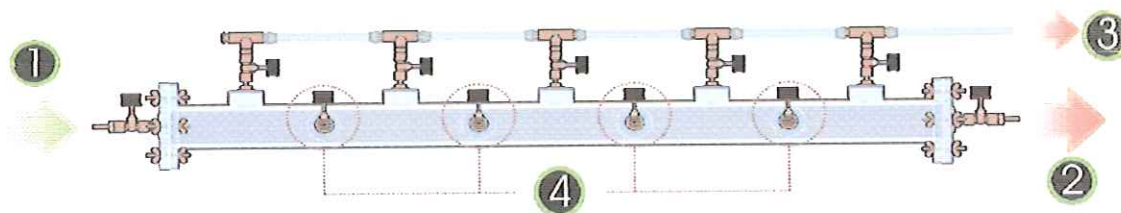


Figura 4.3: Reator anaeróbico horizontal de leito fixo (RAHLF). 01 – Afluente; 02 – Efluente; 03 – Saída de gás; 04 – Coletores de amostra

Os RAHLFs foram construídos em acrílico com comprimento de 100 cm e diâmetro interno de 5 cm, perfazendo uma relação L/D igual a 20 e volume total de 2 litros. Tais reatores anaeróbios foram equipados com coletores de gás ao longo do comprimento localizados na geratriz superior do tubo nas posições L/D igual a 2, 6, 10, 14 e 20, e coletores de amostra alocados nas posições L/D igual a 4, 8, 12 e 16. No início da operação, os RAHLFs foram preenchidos com lodo anaeróbio imobilizado em espuma de poliuretano na forma de partículas cúbicas de 5 mm de lado.

4.9 SUBSTRATO SINTÉTICO

A definição da composição da água residuária utilizada neste trabalho foi realizada após ensaios de atividade hidrolítica com a enzima imobilizada. No desenvolvimento destes ensaios, diferentes fontes de lipídios foram utilizadas, como leite UHT integral, creme de leite, manteiga e óleo de soja. Foram avaliadas, também, diferentes formas de emulsificação dos lipídios, utilizando-se detergentes comerciais, Triton-X 100 e goma arábica como tensoativos.

A enzima utilizada apresentou maior atividade catalítica aos lipídios presentes no azeite de oliva. Na premissa de obtenção de resultados do RAHLF tratando água residuária à base de lipídios e com baixas concentrações de outros constituintes como carboidratos e proteínas, optou-se, então, pela utilização do azeite de oliva como fonte de lipídios.

A água residuária sintética, apresentada na Tabela 4.2, foi a que apresentou os melhores resultados de atividade enzimática e melhor se adequou às concentrações desejadas no trabalho. Esta água era constituída por lipídios (azeite de oliva) e solução de nutrientes proposta por Del Nery (1993), emulsionados com goma arábica por meio

de liquefação, apresentando DQO de 8748 ± 711 mg/L, concentração de óleos e graxas de 1820 ± 512 mg/L e pH igual a $8,0 \pm 0,3$.

Tabela 4.2: Composição da água residuária sintética à base de lipídios

Composto	Concentração (mg/L)
azeite de oliva	3.000,00
Goma arábica	0,2
Uréia (NH ₂ CONH ₂)	62,5
NiSO ₄ .6H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,5
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,25
CaCl ₂ .2H ₂ O	23,5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,04
SeO ₂	0,035
KH ₂ PO ₄	42,5
K ₂ HPO ₄	10,85
Na ₂ HPO ₄	16,7
NaHCO ₃	1.000,00

Foi preparada uma solução estoque dos sais minerais cujas concentrações foram determinadas por estequiometria. Estas concentrações foram determinadas de forma a se obter uma concentração desejada através da adição de 1 mL da solução por litro de água residuária sintética. As alíquotas de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e de goma arábica eram transferidas para um liquidificador industrial, juntamente com a solução de sais e o azeite de oliva. Esta solução, preparada com água destilada para evitar a presença de cloro, era mantida sob agitação durante 10 minutos, para obtenção de uma emulsão estável.

A água residuária à base de lipídios era preparada diariamente e mantida à temperatura de $30,0 \pm 0,5$ °C. Os reservatórios também eram substituídos diariamente a fim de evitar uma maior variação nas características do afluente.

4.10 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas utilizadas no monitoramento dos sistemas experimentais e os respectivos métodos empregados para suas determinações são apresentadas na Tabela 4.3. Por não constar como procedimento analítico de rotina em

laboratórios da área de saneamento, o método de Sedmak e Grossberg (1977) para determinação de proteínas é apresentado em detalhes no item 4.12.4.

Os lipídios foram determinados pelo método da sulfofosfovanilina, conforme metodologia proposta por Blundi (1988). Este método consiste na adição dos ácidos sulfúrico e fosfórico concentrados e solução de vanilina à amostra. Na presença de lipídios, obtém-se uma cor rosa. Realiza-se, então, a leitura da absorbância a 537 nm em espectrofotômetro. Verifica-se a adequação da amostra à faixa de sensibilidade e calcula-se a concentração de lipídios por meio de uma curva-padrão, previamente construída com azeite de oliva.

Tabela 4.3: Parâmetros analisados, métodos e referências bibliográficas

Parâmetro	Método	Referência Bibliográfica
DQO (mg/L)	Colorimétrico	APHA; AWWA; WPCF (1997)
Sólidos (mg/L)	Gravimétrico	
Concentração de CH ₄ no biogás (μmol/L)	Cromatografia	
pH (unidade)	Potenciométrico	
Temperatura (°C)	Medida direta	
Óleos e Graxas (mg/L)	Extração Soxhlet	
Lipídios (mg/L)	Colorimétrico	BLUNDI (1988)
Ácidos Voláteis (mg/L)	Cromatografia	MORAES et al. (2000)
Ácidos Voláteis (mgHAC/L)	Titulométrico	DILALO e ALBERTSON (1961)
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)	Titulométrico	RIPLEY et al. (1986)
Proteínas	Colorimétrico	SEDMAK e GROSSBERG (1977)
Vazão (L/d)	Volumétrico	-
Produção de Gás (mL)	Deslocamento de Líquido	-
EDX	Microscopia Eletrônica	APHA; AWWA; WPCF (1997)
Absorção Atômica	Colorimétrico	

4.11 EXAMES MICROBIOLÓGICOS E ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR

Neste trabalho, foram realizados exames microscópicos e análises de Biologia Molecular utilizando-se as técnicas de hibridação fluorescente *in situ* (FISH), para caracterização morfológica e quantificação dos microrganismos, e de PCR/DGGE para análise da estrutura e diversidade microbiana presente no RAHLF.

4.11.1 Exames Microbiológicos

Durante a etapa II, o lodo anaeróbio foi observado em microscópio óptico após 30 dias de operação e ao final do experimento (100 dias de operação). Na etapa III, os exames foram realizados em amostras coletadas após 98 dias de operação, onde encerrou-se o monitoramento.

Foram realizados exames microscópicos das amostras empregando-se microscopia óptica de luz comum, de contraste de fase e de fluorescência, em aparelho LEICA DMLB, com sistema de câmera digital Optronics. O *software* utilizado para a aquisição das imagens foi o *Image Pro-Plus* versão 4.5.0. Através desse equipamento foi possível captar as imagens e registrar os tipos morfológicos presentes nas amostras.

Para a realização dos exames microscópicos, as matrizes de poliuretano provenientes do RHALF foram acondicionadas em frasco de antibiótico e submetidas à atmosfera de nitrogênio (100%). Todas as amostras foram examinadas em lâminas de vidro cobertas com filme de ágar 2%.

4.11.2 Avaliação da Estrutura da Comunidade Microbiana Presente no RAHLF

4.11.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o protocolo de Melvin e Hobson (1994). Neste procedimento, utilizou-se o *pellet* de 0,20g – 0,50g (peso úmido); lavou-se o *pellet* com 3 mL PBS pH 7,4 (NaCl; KCl; KH₂PO₄; Na₂HPO₄); centrifugou-se a 6.000 rpm por 4 minutos a 4 °C (Mikro 22R Hettich Zentrifugen); descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu o precipitado com 1,0 mL de tampão TESC pH 8,3 (10mM Tris; 1mM EDTA; 0,1mM NaCl); congelou-se a amostra a –80 °C por 10 minutos. Após o descongelamento, centrifugou-se a amostra a 6.000 rpm por 4 minutos a 4 °C (Mikro 22R Hettich Zentrifugen); ressuspendeu-se o *pellet* em 300 µL de tampão TESC; adicionou-se 5 µL de DMSO e agitou-se por 3 a 5 minutos. Na sequência, adicionou-se 500 µL de guanidina tiocianato 5M e 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v); centrifugou-se a 6.000 rpm por 10 minutos a 4 °C (Mikro 22R

Hettich Zentrifugen); transferiu-se a fase aquosa ($\pm 1000\text{mL}$) para outro tubo e adicionou-se 50% desse volume em acetato de amônio (7,5M); misturou-se e dividiu-se em 3 tubos *eppendorf*; precipitou-se o DNA com 1000 μL de etanol absoluto; centrifugou-se a 6.000 rpm por 10 minutos a 4 °C (Mikro 22R Hettich Zentrifugen); lavou-se o DNA com 500 μL de etanol 70%; centrifugou-se a 6.000 rpm por 3 minutos a 4 °C (Mikro 22R Hettich Zentrifugen); secou-se o *pellet* de DNA em temperatura ambiente por 15 minutos; ressuspendeu-se o *pellet* em 50-100 μL de tampão TE (pH 8,3); e armazenou-se a -20°C .

4.11.2.2 Agarose em Gel Eletroforético

A agarose em gel eletroforético foi preparada em duas concentrações, 1 e 2%. Na concentração de 1% foi utilizado o marcador λ Hind III fragment, sendo aplicado na verificação da integridade do DNA. A concentração de 2%, ensaiada com o marcador ϕ K 174 HAE III digest, foi utilizada na verificação do resultado da amplificação pela PCR.

O procedimento analítico iniciou-se com a preparação das soluções 1% ou 2% de agarose com solução tampão TAE X 1. Na seqüência transferiu-se o gel para “bandeja”, e colocou-se o “pente”, para formar os “poços”. Preparou-se a amostra no parafilme usando 5,0 μL de extrato de ácido nucléico ou produto do PCR com 2,0 μL de *loading dye*, misturou-se bem a amostra com auxílio de pipeta automática, e transferiu-se as amostras para os “poços” do gel. Foi utilizado o aparelho (Electrophoresis Power Supply EPS 301 - Amersham pharmacia biotech) com programação de 75 V constante por 40 minutos, sendo transferido o gel para um recipiente com brometo de etídio com auxílio de espátula. Na seqüência, aguardou-se 15 minutos, lavou-se o gel em outro recipiente, com água Milli-Q, por 5 minutos. Já na fase final do procedimento, colocou-se a amostra na câmara Eagle Eye TM III (Stratagene) sob exposição a 254 nm UV e realizou-se a leitura no computador acoplado a câmara, utilizando o software Eagle Sight.

4.11.2.3 Amplificação por PCR

Nesta etapa, foram utilizados *primers* específicos para os Domínios *Bacteria* e *Archaea*.

Para a amplificação do DNAr 16S do Domínio *Bacteria*, foi usado o *primer forward* 968 F (5'- AACGCGAAGAACCTTAC -3') com GC clamp (5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG -3') e o *reverse* 1392 R (5'- ACG GGC GGT GTG TAC -3') (NIELSEN *et al.*, 1999).

Para a amplificação do DNAr 16S do Domínio *Archaea*, foi utilizado o *primer forward* 1100F (5'- AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGAG -3') com GC clamp (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG -3') e o *reverse* 1400R (5'- CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC -3') (KUDO *et al.*, 1997; OYAIZU *et al.*, 2000).

Na reação de amplificação foi utilizado o volume por reação de 50µL com as soluções: “*Taq* DNA polymerase” (5U/µl); 10 x Tampão PCR (com 1,5mM MgCl₂); dNTP (2mMcada); 20 pmol do *primer forward* e do *primer reverse*; 50-100ng de DNA (*template*).

O aparelho utilizado na amplificação foi o termociclador “Gene Amp. PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn). As condições usadas na programação do aparelho para a amplificação do fragmento de DNAr 16S foram de acordo com cada Domínio, apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Programas de amplificação por PCR, para o respectivo Domínio dos fragmentos de DNAr 16S.

Condição do PCR	<i>Bacteria</i> (Nielsen <i>et al.</i> , 1999)	<i>Archaea</i> (Oyaizu <i>et al.</i> , 2000; Kudo <i>et al.</i> , 1997)
Número de ciclos	30	35
Desnaturação inicial	94° C 5 minutos	94° C 90 segundos
Desnaturação	94° C 45 Segundos	94° C 30 segundos
Anelamento	38° C 45 Segundos	55° C 30 segundos
Extensão	72° C 1 minuto	72° C 90 segundos
Final da extensão	72° C 5 minutos	72° C 3 minutos
Resfriamento	4° C	4° C

4.11.2.4 Separação dos fragmentos dos genes amplificados por PCR utilizando a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

O procedimento dessa análise iniciou-se com a preparação da solução do gel gradiente desnaturante (40% de gel acrilamida; solução 50 x TAE; formamida e uréia) na concentração desejada. Foram ensaiadas concentrações de 30% e 60%; 35% e 55% com intuito de adequar a cada tipo de amostra estudada. Os géis foram preparados em tubos de centrífuga de 15 mL. Na solução de maior concentração utilizou-se 14mL, com os reagentes, 100 µL de solução tampão (corante); 100 µL de APS 10%; e 10 µL de temed. Na solução de menor concentração utilizou-se 14mL com 100 µl de APS 10%; e 10 µl de temed. Na solução de 0% foi utilizado 3 mL acrescido de 20 µl de APS 10%; e 2 µl de temed. Na seqüência, os géis foram transferidos (maior e menor concentração) simultaneamente para o “sanduíche” de placas de vidro, com auxílio de duas seringas presas ao aparelho injetor. Após 10 minutos, foi colocado uma placa semelhante a um pente, para formar os poços. Na seqüência adicionou-se a solução do gel sem gradiente desnaturante. A amostra foi preparada misturando-se 20µL de template com 4µL de solução tampão (corante). A “corrida” procedeu-se a temperatura constante de 60 °C. As condições da corrida foram, voltagem de 130 V e tempo de 6,5 horas. A solução fluorescente utilizada foi a de Vistra green (diluída 10.000 vezes). O aparelho utilizado para leitura dos padrões de bandas obtidas no DGGE, foi o Eagle Eye TM III (Stratagene) sob exposição a 254 nm UV, acoplado a um computador equipado com o software Eagle Sight.

4.11.3 Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada para a quantificação dos microrganismos presentes nos RAHLFs. A metodologia utilizada foi a mesma descrita em Domingues (2002).

4.11.3.1 Sondas de oligonucleotídeos fluorescentes

As amostras foram hibridadas com sondas de oligonucleotídeos específicos ao RNAr 16S dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*. As sondas utilizadas foram marcadas com o corante fluorescente rodamina, na extremidade 5'. A sonda EUB338 foi utilizada para detectar organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* (AMANN *et al.*, 1990). Para o Domínio *Archaea* utilizou-se a sonda ARC915 (RASKIN *et al.*, 1994). A sonda NON338, cuja seqüência de nucleotídeos não se hibrida ao RNAr microbiano (MANZ *et al.*, 1992), foi utilizada como controle negativo para quantificar as porcentagens de hibridações não específicas e de células autofluorescentes.

As especificidades das sondas, as seqüências de bases dos oligonucleotídeos e posições de hibridação do RNAr 16S estão descritas na Tabela 4.5. Os protocolos de hibridação são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.5: Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação *in situ*.

Sonda	Especificidade	Seqüência (5'→3')*	Referência
NON338	Controle Negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	MANZ <i>et al.</i> , 1992
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	AMANN <i>et al.</i> , 1990
ARC915	Domínio <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Stahl e Amann (1991)

*Seqüências de bases obtidas por Amann *et al.* (1995).

Tabela 4.6: Protocolos de hibridação.

Sondas	Temperatura de hibridação	Tampão de hibridação	Temperatura e tempos de lavagem	Tampão de lavagem
NON338	46°C por 1,5h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 15 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225mM NaCl
EUB338	46°C por 1,5h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 15 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225mM NaCl
ARC915	45°C por 2,0h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 20 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225mM NaCl

Fonte: Raskin *et al.* (1994)

4.12 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.12.1 Metodologia de Imobilização da Enzima Lipase em Suporte de Polietileno de Baixa Densidade

Foi utilizada a metodologia de imobilização por adsorção descrita por Murray et al. (1997) e Al-Dury e Yong (2000), na qual as partículas do polietileno de baixa densidade são previamente tratadas com etanol p.a., para facilitar a adsorção da solução enzimática aquosa.

O estágio inicial da imobilização procedeu-se com o tratamento da superfície do suporte (PEBD), por meio da imersão de suas partículas em etanol p.a.. Para cada grama de polietileno, foram adicionados 6,0 mL de etanol, com a finalidade de umedecer a superfície do polímero e facilitar a adsorção da solução aquosa. A mistura de etanol e PEBD era mantida em estufa a 30°C durante 12 horas para evaporar o excesso do álcool. Em um sistema montado conforme representado na Figura 4.4, misturou-se a solução enzimática, partículas do suporte micronizado e água destilada, nas respectivas proporções de 10mL:1g:74 mL. A imobilização por adsorção era conduzida a 90 rpm, 25 °C, por período de 24 horas. Passado esse estágio, procedia-se à filtração a vácuo do material fazendo uso de uma membrana de fibra de vidro GMF 3. Em seqüência, o filtrado era encaminhado para a determinação do conteúdo de proteína. Após secagem em estufa a 30°C, durante 12 horas, as enzimas imobilizadas passavam em último estágio por ensaios de avaliação do procedimento de imobilização.

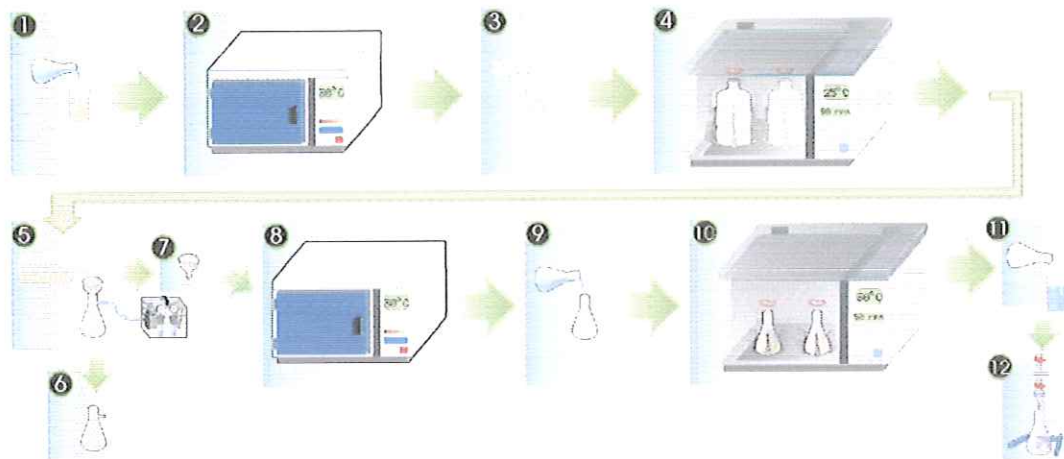


Figura 4.4: Representação esquemática do procedimento experimental de imobilização da enzima e determinação da atividade enzimática. 01 – Tratamento do PEBD com etanol; 02 – Evaporação do excesso de etanol; 03 – Contato solução de lipase/PEBD; 04 – Agitação orbital (24 horas); 05 – Filtração à vácuo; 06 – Filtrado (encaminhado para determinação de proteínas); 07 – Enzima imobilizada (úmida); 08 – Enzima imobilizada (seca); 09 – Contato enzima imobilizada/substrato; 10 – Agitação orbital (30 minutos); 11 – Interrupção da hidrólise enzimática; 12 – Determinação de ácidos graxos

4.12.2 Avaliação do Procedimento de Imobilização da Enzima

A avaliação do procedimento de imobilização foi realizada segundo metodologia descrita por Pereira (1999). Os métodos adotados neste procedimento foram a determinação da melhor relação entre a massa da enzima e do suporte, expressos como porcentagem de recuperação de proteínas (RP%), determinação da atividade enzimática ou hidrolítica, e determinação do rendimento de imobilização (RI%).

4.12.2.1 Determinação da Relação Ótima entre a Massa da Enzima Lipase e do Suporte Polietileno

A determinação da melhor relação entre a concentração da solução de lipase e a massa de polietileno de baixa densidade em pó foi realizada segundo metodologia descrita por Pereira (1999). Seguindo o procedimento, fixou-se a massa do suporte e variou-se a concentração da solução enzimática disponibilizada para imobilização.

Foram preparadas soluções enzimáticas em concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0% (v/v) conforme proposto por Murray et al., (1997), e Al-Duri e Yong, (2000). Após determinação da concentração de proteínas nas soluções de enzima livre e no filtrado após a imobilização, obteve-se a porcentagem de recuperação de proteínas por meio da Equação 4.1.

$$RP(\%) = \frac{P_{ads}}{P_0} \times 100 \quad (4.1)$$

Nesta equação, RP(%) é a porcentagem de proteínas fixadas ao suporte ou porcentagem de enzimas imobilizadas, P_{ads} é a quantidade de proteínas determinada como a diferença entre P_0 e as proteínas remanescentes no filtrado após a imobilização (mg), e P_0 é a quantidade de proteína oferecida para imobilização (mg).

O método utilizado para determinação da concentração de proteínas foi o de Sedmak e Grossberg (1977).

4.12.2.2 Determinação do Teor de Proteína – Enzimas Livres e Imobilizadas

A determinação da concentração de enzimas, expressa como concentração de proteína total das soluções enzimáticas antes e após a imobilização, foi realizada utilizando-se a metodologia de Sedmak e Grossberg (1977). Esse método baseia-se na conversão de uma solução castanho-laranja (Coomassie B. Blue G250 dissolvida em ácido clorídrico) para uma cor azul, sendo quantificada a 620 nm e 465 nm.

Na execução do procedimento analítico, preparou-se o reagente, dissolvendo-se 0,06% de Coomassie B. Blue G250 em ácido clorídrico 2,2% (p/v) e filtrou-se em papel Whatman nº 1 para remover o material não dissolvido. O ensaio foi realizado misturando 2 mL do reagente com 2 mL da amostra de proteínas, em seguida agitou-se a mistura e quantificou-se os valores de absorvância a 620 nm e 465 nm.

Na construção da curva-padrão, foi utilizada uma solução de soroalbumina bovina da marca Sigma referência A-4503 (solução estoque de concentração 100 µg/mL). Foram armazenadas frações da solução padrão em freezer a - 5°C, com a finalidade de utilizar o mesmo padrão quando da construção de novas curvas de calibração. O branco da reação foi obtido substituindo-se a amostra por água. O cálculo

de proteína total, expressa em μg (proteínas)/mL, foi obtido utilizando-se a Equação 4.2.

$$\Delta A = \frac{A^{620\text{nm}} - A^{620\text{nm}}(\text{branco})}{A^{465\text{nm}}} \quad (4.2)$$

Nesta equação, ΔA é a variação de absorbância da amostra, $A^{465\text{nm}}$ a absorbância a 465nm e $A^{620\text{nm}}$ a absorbância a 620nm.

4.12.2.3 Determinação da Atividade Enzimática

Conforme metodologia proposta por Murray et al. (1997), e Al-Duri e Yong (2000), conduziram-se os ensaios de determinação da atividade enzimática nas soluções de enzima (0,2 a 1,0% (v/v)) e nas enzimas imobilizadas. A atividade foi quantificada, mensurando-se a velocidade de hidrólise dos lipídios presentes na água residuária sintética.

Para a enzima imobilizada, misturou-se substrato, água deionizada e a enzima, na respectiva proporção de 30:10:1 (base de peso). Nos ensaios com enzima livre, misturou-se substrato e solução enzimática na proporção de 3:1 (base de peso).

Nos dois casos, manteve-se a mistura sob agitação por 30 minutos a 30°C, em agitador orbital a 60 rpm. Transferiu-se uma alíquota de 6,0 mL para um béquer contendo 20 mL de uma solução de acetona e etanol 50% (v/v) para inativação das enzimas e determinou-se a concentração dos ácidos graxos formados pela hidrólise, titulando-se com uma solução de NaOH 0,05 M, na presença de fenolftaleína.

Após a determinação das unidades de atividade enzimática (U), procedeu-se a determinação do rendimento de imobilização, calculado por meio da Equação 4.3.

$$RI(\%) = \frac{U_I}{U_L} \times 100 \quad (4.3)$$

Nesta equação, $RI(\%)$ é a porcentagem de rendimento de imobilização; U_I são as unidades de atividade enzimática total presentes no suporte; e U_L são as unidades de

atividade enzimática oferecidas para imobilização (soluções enzimáticas com concentrações variando de 0,2 a 1,0% - v/v).

Uma unidade U equivale ao número de μmols de ácidos graxos formados pela hidrólise de 1 mg de lipídios disponíveis no meio, por minuto de reação, sendo determinada a 30 °C e pH igual a $8,0 \pm 0,3$.

4.12.3 Metodologia de Imobilização de Microrganismos Anaeróbios em Espuma de Poliuretano

O trabalho precursor onde se originou a técnica de imobilização de microrganismos anaeróbios em espuma de poliuretano, foi desenvolvido por Zaiat et al. (1994). A metodologia desenvolvida consiste na introdução dos suportes cúbicos de espuma de poliuretano num reservatório contendo lodo anaeróbio macerado e peneirado. A quantidade de lodo deve ser o suficiente para garantir a total imersão dos suportes. Garantido o total contato entre a espuma e a suspensão, procede-se o fechamento do reservatório e repouso por 12 horas.

Antes de enchimento do RAHLF com as biopartículas, realizou-se a lavagem dos sólidos fracamente aderidos à espuma. Tal lavagem foi realizada aspergindo a água residuária sintética utilizada nos experimentos sobre as biopartículas dispostas em um filtro (peneira de malha fina). Foram utilizados 23 g de espuma seca no preenchimento de cada RAHLF. A seqüência de procedimentos está representada na Figura 4.5.

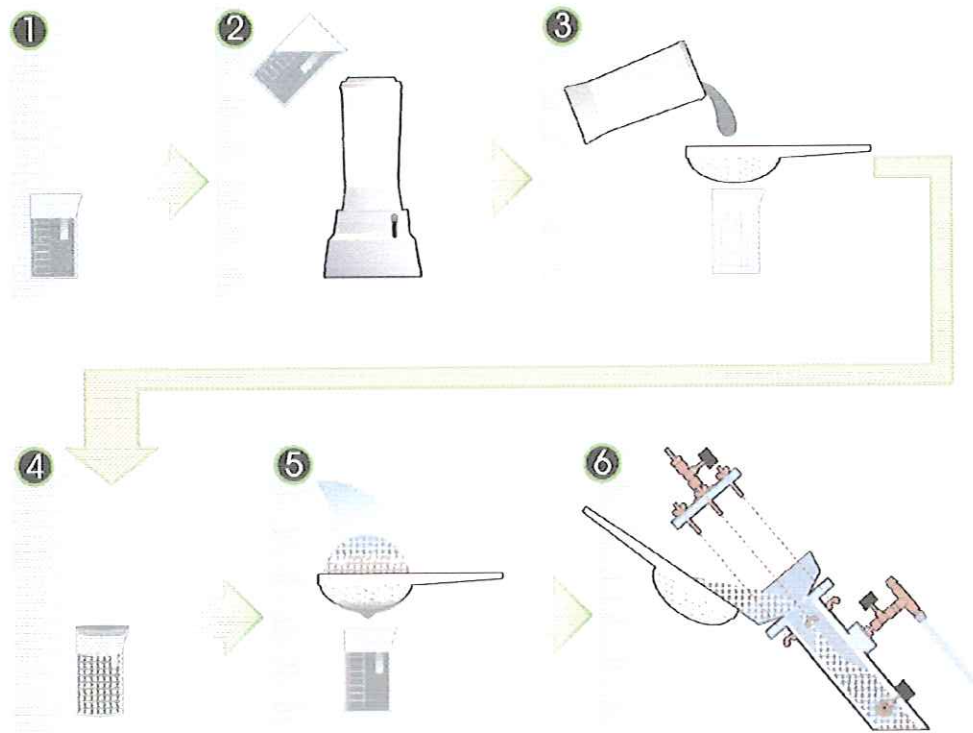


Figura 4.5: Imobilização dos microrganismos anaeróbios em espuma de poliuretano. 01 – Lodo anaeróbio; 02 – Maceração do lodo; 03 – Imersão das partículas de poliuretano no lodo. 04 – Repouso (12 horas, recipiente fechado); 05 – Lavagem para retirada de sólidos não aderidos à espuma; 06 – Enchimento do RAHLF

4.12.4 Operação do Sistema Experimental de Biorreatores Contínuos – Sistema Combinado

A Figura 4.6 mostra, esquematicamente, o fluxograma do sistema experimental utilizado neste trabalho. Neste sistema, a água residuária era bombeada para o reator enzimático de leito expandido invertido (RELI) e para um reator anaeróbio horizontal de leito fixo denominado de controle RAHLF₀₂. O reator anaeróbio horizontal de leito fixo RAHLF₀₁ era alimentado com a água residuária previamente tratada pelo reator enzimático. Foram utilizadas duas bombas peristálticas de dois canais na alimentação dos reatores, sendo alimentados os RAHLFs por gravidade e o RELI por bombeamento direto. As vazões foram ajustadas de acordo com o TDH aplicado aos reatores.



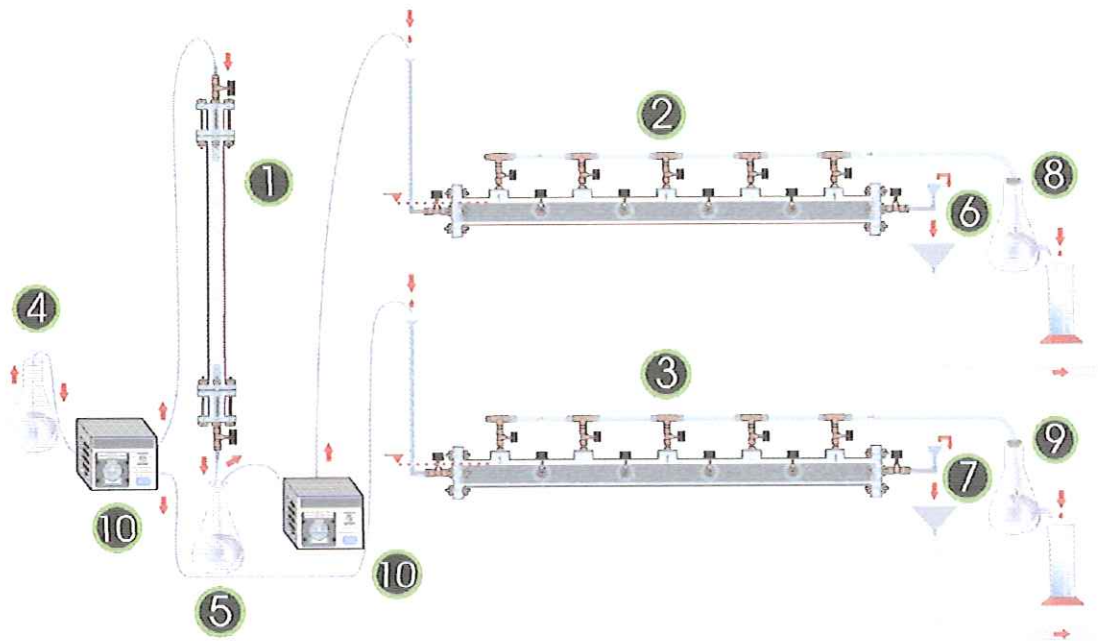


Figura 4.6: Representação esquemática do sistema experimental de biorreatores contínuos (Etapa II). 01 – RELI; 02 – RAHLF₀₁; 03 – RAHLF₀₂; 04 – Afluente; 05 – Afluente pré-hidrolisado; 06 – Efluente sistema combinado; 07 – Efluente RAHLF₀₂; 08 e 09 – Sistemas de medida de volume de gás; 10 e 11 – Bombas peristálticas.

Os RAHLFs eram acoplados a sistemas de medição de vazão dos gases gerados pela degradação anaeróbia do substrato.

Este sistema foi operado em uma câmara com temperatura controlada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo aplicado o tempo de detenção hidráulica de 30 minutos no reator enzimático e 24 horas nos reatores anaeróbios. Após 24 horas de operação, as enzimas imobilizadas utilizadas constantes do leito do RELI, eram substituídas. Para evitar uma parada no sistema de biorreatores contínuos, utilizou-se um segundo RELI. Desta forma, quando um RELI era parado para substituição do recheio, um segundo reator enzimático entrava em operação.

4.12.5 Comparação da Operação do RAHLF e do Reator UASB

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos com o RAHLF no tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios, optou-se pela operação e monitoramento de uma segunda configuração de reator anaeróbio. Como opção

utilizou-se um reator do tipo UASB, uma configuração de reator anaeróbio já estabelecida, consolidada pelo expressivo número de reatores operando em escala real. A Figura 4.7 mostra esquematicamente o fluxograma do sistema experimental utilizado durante a realização da Etapa III.

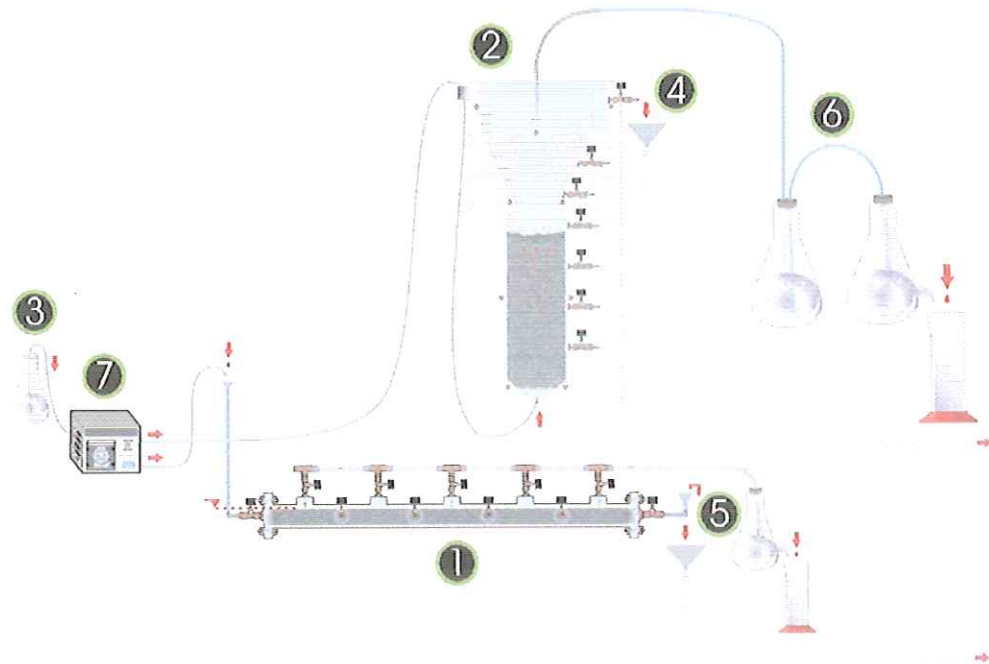


Figura 4.7: Representação esquemática do sistema experimental (Etapa III). 01 – RAHLF₀₃; 02 – UASB; 03 – Afluente; 04 – Efluente UASB; 05 – Efluente RAHLF₀₃; 06 – Selo hídrico e sistema de medida de gás. 07 – Bomba peristáltica.

A princípio, os reatores UASB e RAHLF₀₃ seriam operados com os TDHs de 24, 18, 12 e 8 horas, porém devido ao baixo desempenho apresentado pelo UASB, o mesmo foi operado apenas com o TDH de 24 horas.

Durante o período experimental de investigação da influência da variável TDH na eficiência da remoção da matéria orgânica, operou-se o RAHLF₀₃ com TDH de 24, 18, 12 e 8 horas.

Neste sistema, a água residuária sintética era bombeada simultaneamente para os reatores RAHLF e UASB. A operação procedeu-se em uma câmara com temperatura controlada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, equipada com sistema de aquecimento e recirculação de ar.

Iniciando com um TDH igual a 24 horas, o RAHLF₀₃ foi monitorado até o equilíbrio aparente e analisado por meio de perfil espacial de alguns parâmetros. Na seqüência, alterou-se o TDH para o segundo tempo desejado (TDH = 18 h), seguindo-se

a mesma rotina de procedimentos e análises tanto para este como para os TDH referentes a 12 e 8 h. O tempo total de operação do RAHLF nos diferentes TDH foi de 98 dias.

4.13 FREQUÊNCIA DAS ANÁLISES

As frequências das análises realizadas nas diferentes etapas desta pesquisa são apresentadas na Tabela 4.7.

Durante a etapa I foram contemplados os ensaios referentes à imobilização da enzima, atividade enzimática e avaliação do procedimento de imobilização. Em se tratando de procedimentos experimentais em batelada, as análises foram realizadas de acordo com a demanda e necessidade da avaliação investigatória dos resultados.

Tabela 4.7: Etapa, parâmetro analisado, frequência das análises, pontos de amostragem e tempo total de operação dos sistema

Etapa	Parâmetro	Frequência	Ponto de amostragem	Tempo total de Operação do sistema
II	DQO (mg/L)	2 x por semana	Alimentação dos sistemas, efluente do RELI e efluentes dos RAHLFs	100 dias
	Sólidos (mg/L)			
	pH (unidade)			
	Ácidos Voláteis (mgHAC/L)			
	Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)			
	Lipídios (mg/L)			
	Óleos e Graxas (mg/L)	Semanal		
	Ácidos Voláteis (mg/L)	Perfil espacial	Amostradores L/D = 4, 8, 12 e 16 dos RAHLFs	
	Concentração de CH ₄ no biogás (μmol/L)	2 x por semana		
	III	DQO (mg/L)	2 x por semana	
pH (unidade)				
Lipídios (mg/L)				
Óleos e Graxas (mg/L)				
Ácidos Voláteis (mgHAC/L)				
Alcalinidade (mgCaCO ₃ /L)				
Sólidos (mg/L)		Semanal		
Concentração de CH ₄ no biogás (μmol/L)		2 x por semana	Tubos coletores de gases	
Microscopia Ótica		Final da operação do RAHLF	Amostradores L/D = 4, 8 12 e 16 do RAHLF	
PCR - DGGE				
FISH				
EDX				
Absorção Atômica				Material formado nos interstícios das partículas de poliuretano

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ETAPA I – CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS REATORES RELI E RAHLF

A Etapa I do presente trabalho foi desenvolvida em caráter investigatório com o objetivo de realizar a imobilização de lipase disponível comercialmente, visando a sua utilização em um reator concebido para operar no pré-tratamento de uma água residuária à base de lipídios.

Os ensaios de imobilização da lipase em suporte de polietileno e a avaliação do procedimento de imobilização em ensaios em batelada foram realizados conforme proposto por Murray et al. (1997), Pereira (1999) e Al-Dury e Yong (2000).

Em ensaios de atividade enzimática em batelada, foram utilizados lipídios de diferentes fontes, variações na concentração das soluções à base de lipídios, além de diferentes tipos de tensoativos. Definido o procedimento de imobilização da enzima e confirmado o seu potencial de hidrólise de parte dos lipídios presentes na água residuária sintética, foram realizados ensaios de hidrólise em reator enzimático de leito expandido invertido (RELI).

Todos os resultados apresentados na Etapa I foram obtidos em ensaios realizados em triplicata.

5.1.1. Avaliação do Procedimento de Imobilização da Enzima

5.1.1.1. Determinação do Teor de Proteína – Enzimas Livres e Imobilizadas

A determinação da concentração de enzimas, expressa como concentração de proteína total, nas soluções enzimáticas antes e após a imobilização, foi realizada utilizando-se a metodologia de Sedmak e Grossberg (1977). A Figura 5.1 apresenta a curva-padrão de proteínas utilizada nos cálculos de concentração de enzimas.

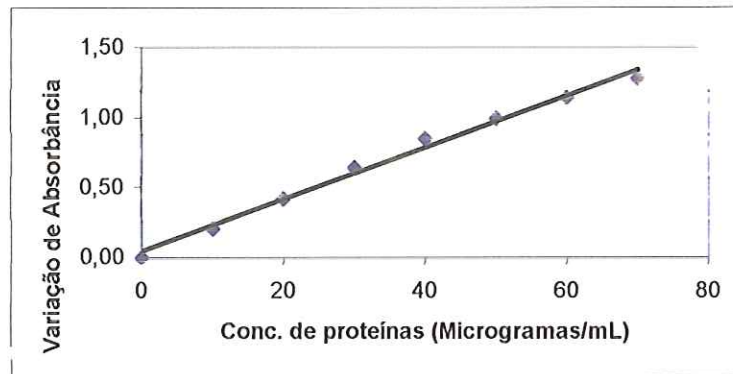


Figura 5.1: Curva padrão de concentração de proteínas, método de Sedmak e Grossberg (1977).

A curva-padrão, apresentada na Figura 5.1, é expressa pela equação 5.1.

$$\Delta A = 0,0185 \times CP + 0,0433 \quad (5.1)$$

Nesta equação, ΔA é a variação de absorbância nas amostras, e CP a concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$). O fator de correlação (R) obtido foi de 0,9954.

A Tabela 5.1 apresenta os resultados obtidos na determinação de proteínas nas soluções enzimáticas disponibilizadas para imobilização e na solução filtrada resultante, após a imobilização da enzima. As soluções padrão de enzimas, preparadas em concentrações variando de 0,2 a 1,0% (v/v), foram diluídas cinco vezes antes da determinação da concentração de proteínas, devido ao ajuste à faixa de concentração da curva-padrão de proteínas. De posse dos resultados de concentração de proteína, procedeu-se o cálculo da recuperação de proteína (RP%), determinando-se a melhor relação entre a concentração de solução enzimática disponibilizada para imobilização e a massa de suporte PB 450.

Os valores de proteína total, expressos em $\mu\text{g}_{\text{proteínas}}/\text{mL}_{\text{solução}}$, foram obtidos utilizando-se a equação (4.2), para determinação da variação de absorbância nas amostras, e a equação (5.1), para determinação da concentração de proteínas.

Tabela 5.1: Valores médios de absorvância, variação de absorvância (ΔA), concentração de proteínas nas soluções enzimáticas disponibilizadas para imobilização e concentração de proteínas no filtrado obtido após a imobilização.

Concentração de enzima % (v/v)	Abs 465nm (média)	Abs 620nm (média)	Varição de Abs (ΔA)	*Conc. De Proteína nas soluções enzimáticas ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. de Proteína no filtrado ($\mu\text{g/mL}$)
BR c/ H ₂ O	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00
BR c/ reag.	0,423	0,152	0,000	0,00	0,00
0,2	0,380	0,250	0,256	11,49	0,00
0,4	0,356	0,324	0,482	23,71	0,00
0,6	0,330	0,392	0,728	37,01	7,55
0,8	0,321	0,434	0,877	45,06	14,63
1,0	0,308	0,493	1,105	57,39	16,31

* amostras diluídas 5 vezes

5.1.1.2 . Recuperação de Proteína (RP%) – Determinação da Melhor Relação entre a Massa da Enzima Lipase e do Suporte Polietileno

Experimentos iniciais envolveram o contato de uma quantidade fixa de suporte com concentrações variadas de soluções enzimáticas, disponibilizadas para imobilização. Este procedimento teve por objetivo determinar a quantidade máxima de enzimas, expressa em concentração de proteínas, que poderia ser adsorvida na superfície do suporte PB 450 pela ação de forças de Wan der Walls.

Foram preparadas soluções enzimáticas em concentrações de 0,2, 0,4, 0,8 e 1,0% (v/v). Os resultados foram obtidos por meio da equação (4.1).

A Tabela 5.2 apresenta resultados com os quais se observa que, nos primeiros pontos (0,2 e 0,4% - v/v), provavelmente a quantidade de enzima disponibilizada para a imobilização não foi o suficiente para utilizar toda a área superficial disponível no suporte. A utilização das soluções enzimáticas nas concentrações de 0,8 e 1,0% (v/v), além de apresentarem porcentagens de recuperação de proteína inferiores à concentração de 0,6% (v/v), resultaria em consumo desnecessário de enzimas, o que aumentaria o custo do processo.

Murray et al. (1997) apresentaram resultados de RP% iguais a 98,47; 98,12, e 92,40%, para respectivas concentrações de soluções enzimáticas de 0,2, 0,4 e 0,8% (p/v). No referido trabalho, foi utilizada uma lipase de *cândida rugosa* e polietileno de

baixa densidade micronizado, com diâmetro de partícula (dp) menor que 400 μm . A metodologia de imobilização foi a mesma utilizada no presente trabalho.

Uma das características observadas na escolha do suporte foi a área superficial disponível para imobilização da enzima. Dessa forma, a concentração da solução enzimática padrão utilizada na imobilização das lipases, para aplicação no pré-tratamento da água residuária à base de lipídios, foi de 0,6% (v/v). Essa solução foi a que ocupou a maior área superficial disponível das partículas do suporte e apresentou a menor concentração de enzima livre no filtrado da imobilização.

Tabela 5.2: Porcentagem de Recuperação de Proteínas

Concentração da solução enzimática % (v/v)	RP(%)
0,2	100,00
0,4	100,00
0,6	95,92
0,8	93,51
1,0	94,32

5.1.1.3 . Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada, conduzindo-se ensaios de hidrólise enzimática em batelada, para determinar o número de moles de ácidos graxos livres produzidos a partir da hidrólise dos lipídios presentes na água residuária sintética. A atividade enzimática foi definida em termos de unidades de atividade (U), segundo a qual cada unidade referida equivale ao número de μmols de ácidos graxos formados pela hidrólise de 1mg de lipídios disponíveis no meio, por minuto de reação, determinada a 30 °C e pH igual a 8,3.

Conduziram-se ensaios de atividade enzimática com a água residuária à base de lipídios, utilizando-se dois diferentes tensoativos: Triton X e goma arábica. A fonte de lipídios de origem vegetal e a solução de nutrientes foram mantidas nas concentrações constantes na composição da água residuária, apresentada no item 4.9. Segundo ROCHA, (2000), os emulsificantes mais usados em ensaios de ação lipolítica sobre triglicerídeos são o Triton-X 100 e goma arábica. Mozzafar et al. (1994) cita que a atividade enzimática da lipase varia de acordo com o tipo e a concentração do tensoativo utilizado no preparo da emulsão.

A Tabela 5.3 apresenta os valores de unidades de atividade enzimática (U), determinados para os ensaios com enzimas na forma livre (U_L) e imobilizada (U_I).

Tabela 5.3: Unidades de atividade enzimática para enzimas livres (U_L) e imobilizadas (U_I), em ensaios realizados com substrato preparado com diferentes tensoativos.

Amostra % (v/v)	Água residuária emulsionada com Triton X-100		Água residuária emulsionada com goma arábica	
	U_L $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	U_I $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	U_L $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$	U_I $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$
0,2	185,18	92,59	216,05	123,46
0,4	185,18	92,59	216,05	154,32
0,6	216,05	92,59	216,05	185,18
0,8	216,05	92,59	185,08	154,32
1,0	185,18	92,59	185,18	154,32

A água residuária sintética à base de lipídios foi preparada com Triton X-100 a uma concentração de 0,6 mL/L, apresentando um pH igual a 5,9. A característica ácida, apresentada na caracterização da água residuária emulsionada com Triton X-100, pode ter influenciado nos ensaios de atividade enzimática, sendo que a enzima utilizada nos procedimentos apresenta maior atividade em meio neutro, conforme declaração constante em ficha técnica da enzima (NOVO NORDISK, 2004).

A partir dos resultados de determinação de unidades de atividade enzimática, foram calculados os rendimentos de imobilização (RI%), utilizando-se a equação (4.3), que são apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Rendimento de imobilização de enzima.

Amostra % (v/v)	Emulsão com Triton X-100	Emulsão com goma arábica
	RI(%)	RI(%)
0,2	50,00	57,15
0,4	50,00	71,44
0,6	42,86	85,73
0,8	42,86	83,34
1,0	50,00	83,34

Os experimentos realizados com soluções enzimáticas preparadas a 0,6% (v/v), apresentaram o melhor rendimento de imobilização nos ensaios de determinação da atividade enzimática.

5.1.2 . Avaliação do Reator Enzimático de Leito Expandido

A Tabela 5.5 apresenta os valores de unidades de atividade enzimática, DQO de amostra não filtrada e lipídios no RELI, operado com TDH de 30 minutos e tempo total de operação de 24 horas.

Tabela 5.5: Unidades de atividade enzimática (U), DQO e concentração de Lipídios obtidas no RELI em um período de 24 horas de operação.

Tempo (h)	Atividade enzimática (U)	DQO (mg/L)	Lipídios (mg/L)
0	--	8800,00	1200,00
2	18,51	1775,00	311,32
4	27,78	1780,00	181,13
6	27,78	1887,00	177,36
8	27,78	1411,50	207,55
10	18,51	1546,00	230,19
12	27,78	1424,50	205,66
14	27,78	1796,00	226,41
16	27,78	1871,50	294,34
18	37,04	3566,50	526,41
20	27,78	2900,00	590,57
22	27,78	2098,00	645,28
24	27,78	1941,00	466,04
Leito - RELI (após 24 horas)	--	2964,00	437,74

Os procedimentos analíticos realizados nas amostras do RELI foram um complicador no desenvolvimento desta pesquisa. A princípio, seria feita a determinação de lipídios na água residuária e nas amostras do efluente do reator enzimático. Porém, uma das etapas da metodologia definida, anteriormente apresentada (BLUNDI, 1988), era o tratamento das amostras com ácido sulfúrico. Esse procedimento resultava na hidrólise ácida dos lipídios presentes nas amostras de efluente, e não permitia diferenciar e quantificar os lipídios hidrolisados por via enzimática dos que sofreram hidrólise ácida. Métodos como o da sulfofosfovalinina, utilizados para determinação de lipídios totais, são baseados no princípio da reação em meio ácido, da vanilina com os ácidos graxos liberados por hidrólise com ácido sulfúrico (LABTEST, 1985; DOLES, 2004). Frente a esses fatos, a quantificação da hidrólise realizada no RELI foi avaliada a partir da determinação da atividade enzimática por meio de análise titulométrica, para determinação do número de moles de ácidos graxos livres produzidos a partir da

hidrólise dos lipídios presentes na água residuária sintética em um determinado período de tempo.

Após período de 24 horas de operação, o leito do RELI, não mais apresentou características de expansão, com acúmulo de partículas do meio (enzimas imobilizadas) na parte inferior do reator. Nestas condições, o reator começou a apresentar problemas hidrodinâmicos, caracterizados por aumento de pressão no sistema de bombeamento, seguido de obstrução dos distribuidores de fluxo da parte inferior do reator e entupimento. Também se tornou visível o acúmulo de material graxo adsorvido no leito de enzimas imobilizadas, demonstrando que o RELI também funcionou como uma caixa de gordura.

A determinação de DQO em amostras do material de preenchimento do reator, após a operação por período de 24 horas, também foi realizada com um certo grau de dificuldade, pois o aumento de temperatura de 140 °C inerente ao método, derreteu as amostras compostas por PEBD. Outra possibilidade experimentada foi a quantificação do material constituinte do leito do RELI empregando a metodologia para determinação de óleos e graxas. Este método também apresentou problemas analíticos, com dificuldade de gotejamento das amostras no filtro coberto com terra de infusório e com passagem de parte dos lipídios pelo filtro durante a filtração à vácuo.

Os valores de unidades U de atividade enzimática apresentados pelo RELI, foram baixos, variando de 18,51 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ a 37,04 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$. Se comparados aos resultados apresentados em ensaios em reator batelada (utilizado na determinação da atividade enzimática, conforme item 4.12.2.3), com valores variando de 123,46 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ a 185,18 $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$, a utilização do RELI seria inviável tecnicamente, caso comparado apenas a eficiência dos sistemas.

Neste trabalho inicial, contemplou-se a utilização de um sistema contínuo de biorreatores, não sendo avaliada a utilização de um sistema operado em batelada como alternativa de pré-tratamento. Outra hipótese abordada pelo grupo de pesquisa foi a avaliação do comportamento do RAHLF tratando água residuária contendo lipídios, por se tratar de uma configuração de reator ainda não experimentada no tratamento deste tipo de efluente, e que apresenta resultados muito positivos no tratamento de águas residuárias com diferentes características, conforme referências apresentadas no item 3.7.

5.2. ETAPA II - OPERAÇÃO E MONITORAMENTO DO SISTEMA DE BIORREATORES CONTÍNUOS - SISTEMA COMBINADO

A utilização de um sistema de reatores combinados (RELI-RAHLF₀₁), utilizando enzimas comercialmente disponíveis como lipases, teve por objetivos investigar a hipótese de possibilidade de diminuição do tempo de residência nestes reatores com conseqüente aumento na capacidade de tratamento devido a uma pré-hidrólise das macromoléculas e minimizar os possíveis efeitos causados pela alta concentração de lipídios em reatores anaeróbios, conforme apresentado no item 3.5.

Conforme objetivos específicos apresentados no item 2.2, a Etapa II é caracterizada pela operação e monitoramento do sistema experimental de biorreatores contínuos combinados (RELI seguido de RAHLF₀₁) e pelo RAHLF₀₂ de controle. Este sistema foi operado em uma câmara com temperatura controlada a $30\pm 1^\circ\text{C}$, sendo aplicado um tempo de detenção hidráulica de 30 minutos no reator enzimático e 24 horas nos reatores anaeróbios.

5.2.1. Avaliação do Desempenho do Sistema Experimental de Biorreatores Contínuos

A avaliação do desempenho do sistema experimental de biorreatores contínuos foi realizada mediante comparação dos resultados das análises do efluente do sistema RELI-RAHLF₀₁, efluente do RAHLF₀₂ (controle) e de perfis espaciais nos RAHLFs, conforme apresentado no item 4.13.

5.2.2. Avaliação do Desempenho de Reatores Combinados Enzimático-Biológico

5.2.2.1. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A Figura 5.2 apresenta a variação temporal da DQO do sistema experimental de biorreatores contínuos. Os valores médios da DQO afluyente de amostras não filtradas e da DQO afluyente de amostras filtradas foram, respectivamente, 8748 ± 711 mg/L e 1199 ± 354 mg/L, sendo que os valores máximos e mínimos foram de 9864 mg/L e 6895 mg/L para o afluyente bruto e 1870 mg/L e 452 mg/L para o afluyente filtrado, respectivamente.

O sistema combinado (RELI/RAHLF₀₁) apresentou eficiências médias de remoção de DQO de amostras não filtradas e filtradas de $99,0 \pm 0,3\%$ e $95,9 \pm 1,8\%$, respectivamente, enquanto que o reator anaeróbio controle apresentou eficiências médias de $98,9 \pm 0,4\%$ e $95,8 \pm 2,4\%$.

Por se tratar de uma água residuária sintética contendo azeite de oliva como fonte de lipídios, uma configuração de reator nunca antes alimentado especificamente com lipídios, e um sistema (enzimático/biológico) também nunca antes proposto, a comparação direta com dados da literatura não seria viável.

Em trabalho desenvolvido também desenvolvido no Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC/USP, Modolo (2002), operou um sistema constituído por dois reatores de lodos ativados, sendo um alimentado com uma água residuária sintética elaborada conforme o apresentado no item 4.9 do presente trabalho e o outro reator alimentado com a água residuária previamente tratada pelo RELI. Os valores médios da DQO de amostras não filtradas foram de 1293 ± 262 mg/L no efluente do sistema combinado (RELI/Lodos Ativados) e de 1807 ± 710 mg/L no reator aeróbio utilizado como controle. Esses valores foram bem superiores aos observados para os efluentes do do sistema RELI/RAHLF₀₁ e RAHLF₀₂, com valores médios de DQO de 98 ± 36 mg/L e 101 ± 43 mg/L, respectivamente. Esses valores demonstraram melhor desempenho dos sistemas utilizando o reator anaeróbio, com ou sem o pré-tratamento, em relação ao apresentado pelos sistemas utilizando lodos ativados.

Alves et al. (1997) monitoraram dois reatores de leito fixo tratando águas residuárias de laticínios com DQO de 9000 mg/L e concluíram que os lipídios presentes no meio não afetaram o desempenho do sistema, mas reduziram a fração de biomassa aderida. No presente trabalho não foi observada redução de biomassa aderida, tendo sido verificada a baixa concentração de SVT no efluente dos RAHLFs.

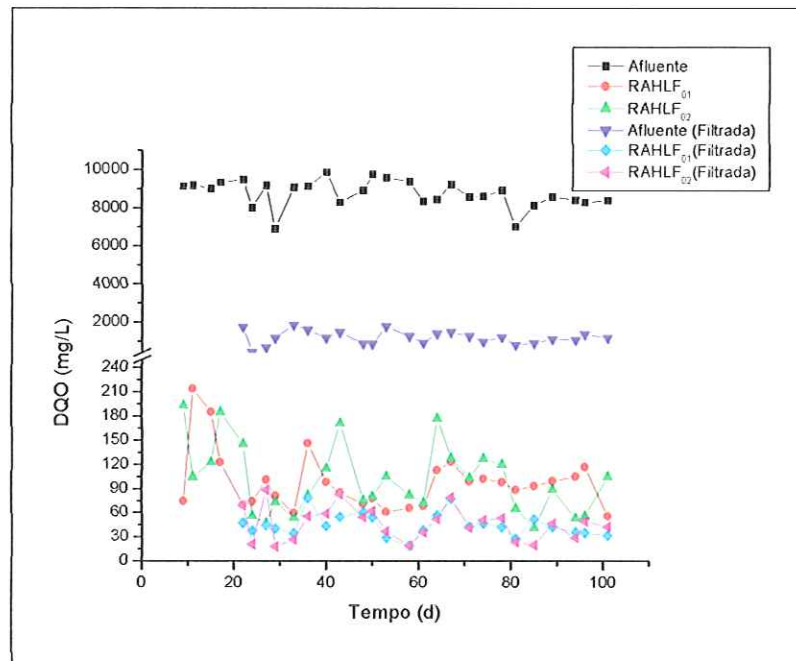


Figura 5.2: Perfil temporal da DQO do afluente e do efluente, de amostras bruta e filtrada, no sistema de reatores contínuos.

5.2.2.2 . Óleos e Graxas (O e G)

A eficiência medida de remoção de lipídios, determinados como óleos e graxas, foi de $94,9 \pm 3,2\%$ para o sistema combinado e $94,2 \pm 2,8\%$ para o reator anaeróbico controle. A Figura 5.3 apresenta as variações da concentração de óleos e graxas, respectivamente, no sistema combinado e no reator controle.

Os valores médios de óleos e graxas do afluente, do efluente do sistema combinado e do efluente do sistema de controle foram, respectivamente, 1820 ± 512 mg/L, $91 \pm 43,25$ mg/L e $92 \pm 38,24$ mg/L, sendo que os valores máximos e mínimos foram de 2809 mg/L e 1707 mg/L para o afluente, 182 mg/L e 162 mg/L para o efluente do sistema combinado e 158 mg/L e 139 mg/L para o efluente do reator controle. Esses valores demonstram serem os desempenhos da mesma ordem de grandeza tanto no sistema combinado como no reator de controle.

Modolo (2002) obteve valores de eficiência de remoção de óleos e graxas de 91% no sistema RELI/Lodos Ativados e 84% no reator aeróbico controle.

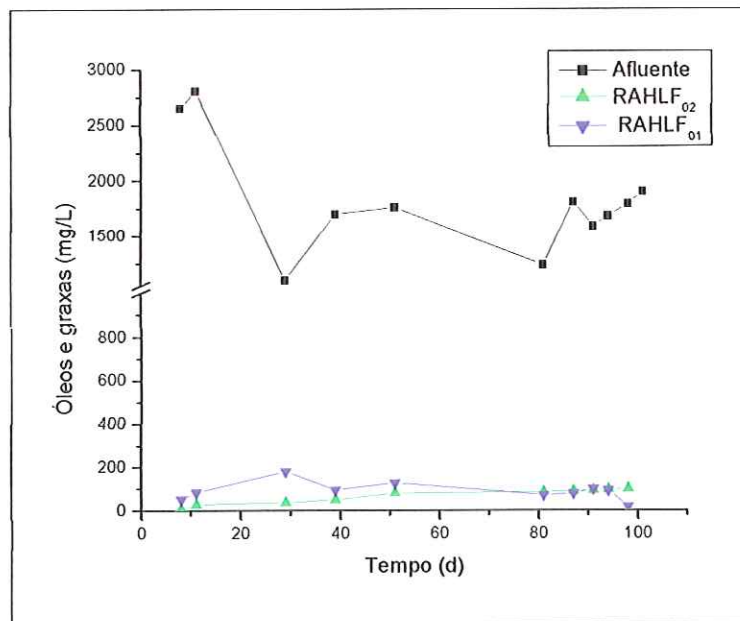


Figura 5.3: Variação da concentração de óleos e graxas para o reator de controle e para o sistema combinado

5.2.2.3 . Alcalinidade

Houve geração de alcalinidade a bicarbonato em ambos os reatores anaeróbios, indicando boa estabilidade operacional durante todo o período estudado (Figura 5.4). Valores de 556 ± 30 mg CaCO_3/L foram observados no afluente, enquanto valores médios de 605 ± 61 mg CaCO_3/L e 612 ± 56 mg CaCO_3/L foram observados no efluente do sistema combinado e do sistema controle, respectivamente. A geração de alcalinidade à bicarbonato é indicativo de estabilidade do processo de degradação anaeróbia.

5.2.2.4 . Ácidos Voláteis

A Figura 5.5 apresenta o comportamento dos sistemas com relação aos ácidos voláteis totais. Os valores dos ácidos voláteis totais (AVT) para o afluente variaram entre 28 e 83 mg HAc/L , apresentando valor médio 52 ± 15 mg HAc/L . No efluente do sistema combinado, os AVT variaram de 25 a 110 mg HAc/L , com valor médio 49 ± 20 mg HAc/L . Para o efluente do reator controle, os ácidos voláteis apresentaram variação de 25 a 102 mg HAc/L , com um valor médio de 48 ± 17 mg HAc/L . Observou-se que não houve alteração significativa na concentração de AVT, o que demonstra que os

sistemas atingiram estabilidade operacional, tanto o composto por reator anaeróbio precedido por reator enzimático, como o reator controle.

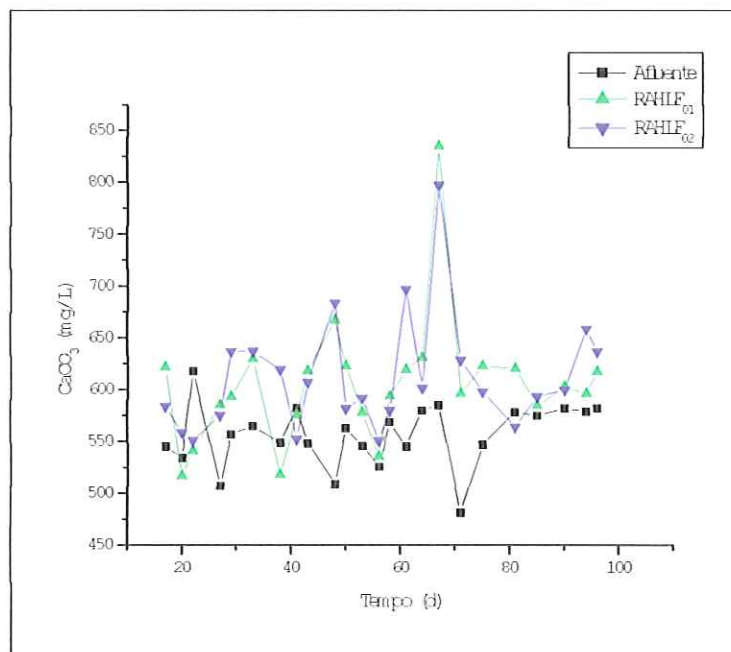


Figura 5.4: Valores de alcalinidade a bicarbonato determinados para o sistema combinado e reator de controle.

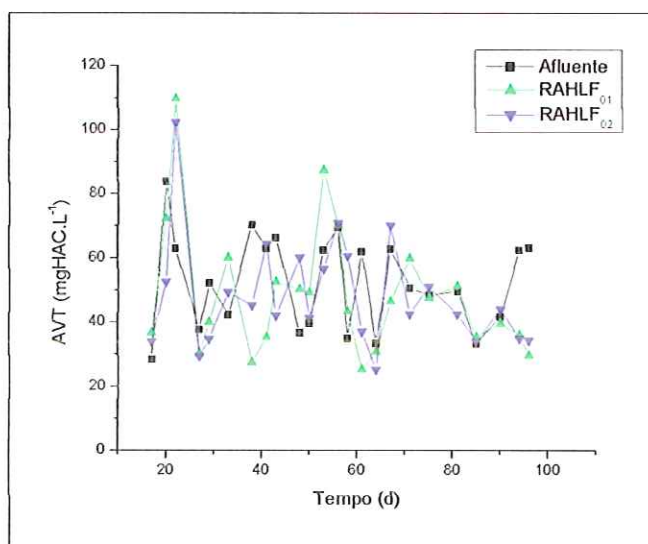


Figura 5.5: Valores de AVT determinados para o reator do sistema combinado e de controle.

5.2.2.5 . Potencial Hidrogeniônico (pH)

Não houve variações significativas de pH, que manteve-se, durante os 100 dias de operação, nas faixas de 7,7 a 8,3 (afluente); 7,0 a 8,3 (efluente do sistema

combinado); e 7,0 a 8,0 (efluente do reator controle). Esses resultados confirmam o observado para alcalinidade à bicarbonato e ácidos voláteis totais, demonstrando boa estabilidade operacional de ambos os sistemas.

5.2.2.6 . Sólidos

A Figura 5.6 apresenta a variação da concentração de sólidos totais no sistema combinado e no reator controle. O valor médio da concentração de sólidos totais no afluente foi $3970 \pm 675,69$ mg ST/L com valores máximo e mínimo iguais a 5954 mg ST/L e 2517 mg ST/L, respectivamente. A concentração média de sólidos totais na saída do reator de controle foi de $940,55 \pm 153,28$ mg ST/L, com valores máximo e mínimo iguais a 1434 e 766 mg ST/L e na saída do reator combinado foi igual a $897,62 \pm 90,73$ mg ST/L, com valores máximo e mínimo iguais a 1170 e 752 mg ST/L, respectivamente.

O afluente apresentou um valor médio de concentração de sólidos suspensos totais igual a $2217,54 \pm 386,08$ mg SST/L, cujo valor máximo alcançou 2927 mg SST/L e valor mínimo igual a 1447 mg SST/L. Os valores médio, máximo e mínimo para o reator de controle foram $54,28 \pm 22,18$, 126 e 32 mg SST/L, respectivamente, e para o reator combinado foram $61,73 \pm 43,42$, 183 e 26 mg SST/L, respectivamente.

Os valores de sólidos suspensos voláteis (SSV) médio, máximo e mínimo do afluente eram, respectivamente, $2190 \pm 337,12$, 2897 e 1446 mg SSV/L. Na saída do reator controle, estes valores foram $44 \pm 20,77$, 116 e 14 mg SSV/L, e na saída do combinado foram $53 \pm 43,58$, 168 e 13 mg SSV/L.

As análises de sólidos voláteis totais (SVT) para o afluente resultou em valores médio, máximo e mínimo iguais a $3349 \pm 680,36$, 5308 e 1884 mg SVT/L, respectivamente. Na saída do reator controle, o valor médio foi de $317 \pm 140,68$ mg SVT/L, sendo os valores máximo e mínimo iguais a 728 e 128 mg SVT/L. O reator combinado, por sua vez, apresentou valor médio de saída igual a $290 \pm 83,84$ mg SVT/L e valores máximo e mínimo iguais a 528 e 144 mg SVT/L.

Não foi observado nenhum comportamento específico de remoção de sólidos dos RAHLFs. Os valores de concentração de SVT no efluente desses reatores indicam que não houve arraste de biomassa do sistema.

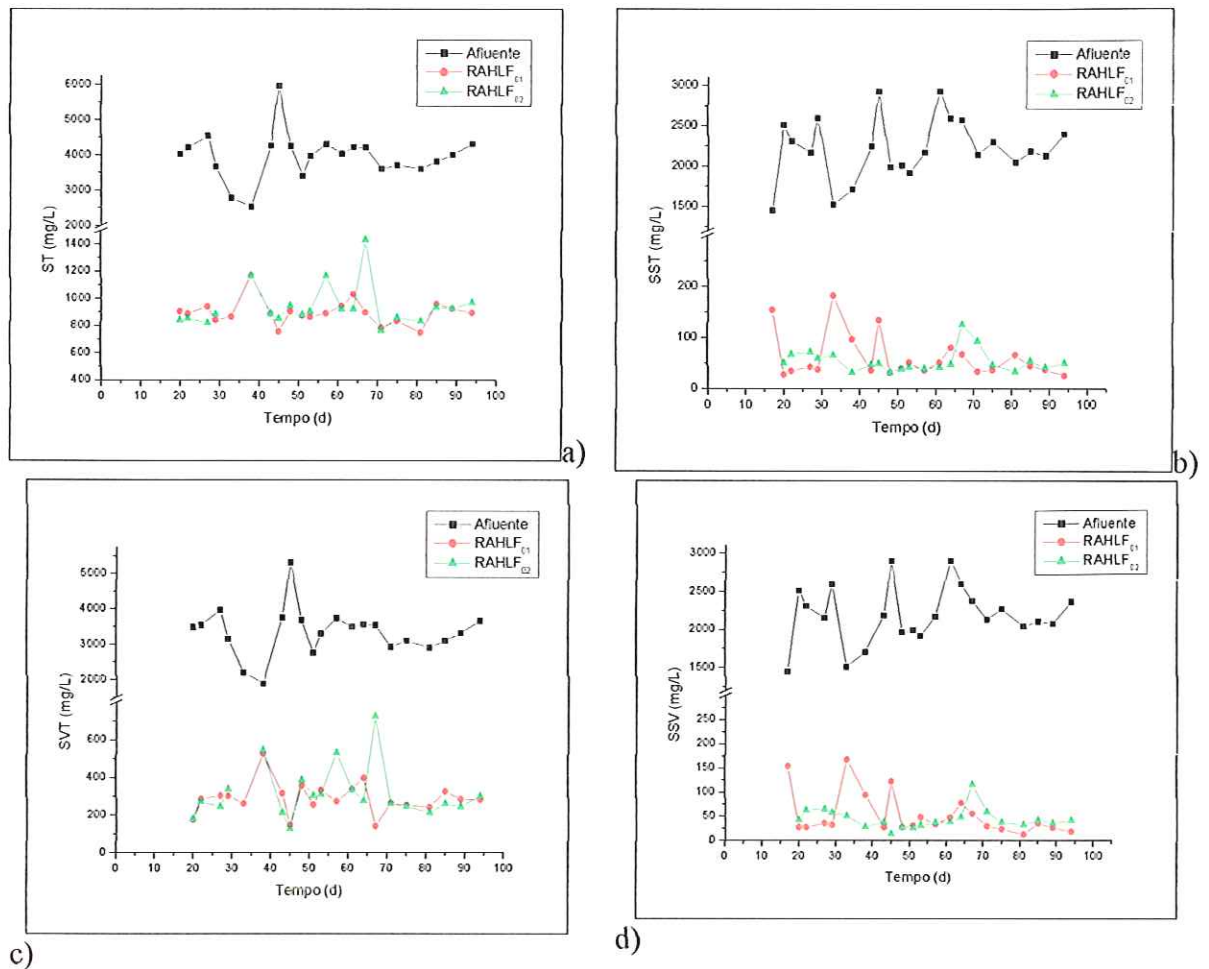


Figura 5.6: Valores de sólidos para o sistema combinado e reator de controle. a) Sólidos totais; b) Sólidos suspensos totais; c) Sólidos voláteis totais; d) Sólidos suspensos voláteis.

5.2.2.7 . Concentração de metano (CH_4) no biogás

O sistema de dosagem do volume de gás produzido no sistema não foi eficiente, apresentando dias com deslocamento de volume de líquido elevado, e pouco ou nenhum deslocamento por períodos de até três dias. Provavelmente ocorreu a saída de gases na corrente líquida do reator, não sendo possível, portanto, quantificar o gás produzido.

A composição de metano no RAHLF_{01} foi de $6,0 \cdot 10^{14} \pm 4,17 \cdot 10^{14} \mu\text{mol/L}$, e no RAHLF_{02} foi $8,37 \cdot 10^{14} \pm 4,59 \cdot 10^{14} \mu\text{mol/L}$.

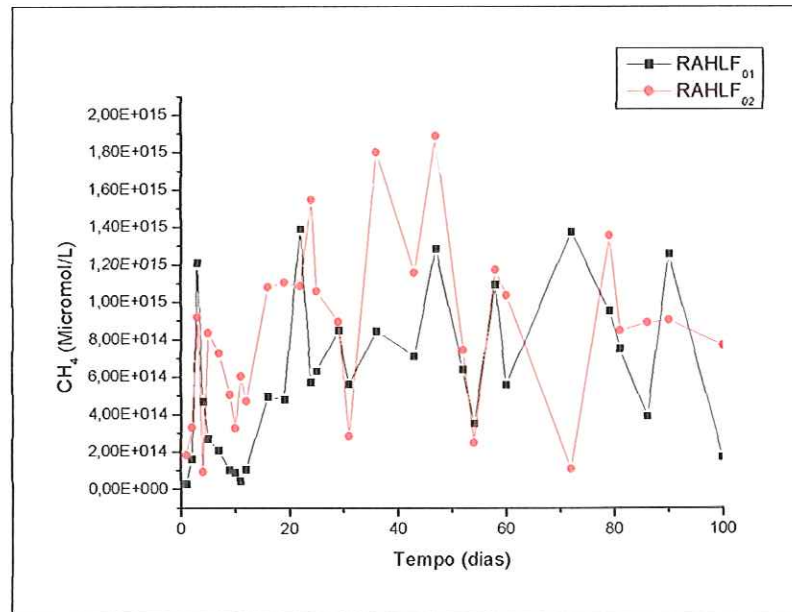


Figura 5.7: Valores de gás metano no sistema combinado e reator de controle

5.2.3 . Considerações Finais da Etapa II

O sistema de reatores combinados apresentou um bom resultado tanto na remoção de matéria orgânica como na remoção de lipídios, expressos na forma de óleos e graxas, cumprindo com o objetivo proposto para o sistema. O reator anaeróbico horizontal de leito fixo operado como controle apresentou resultados com ordem de grandeza bem próxima aos obtidos no sistema combinado.

Os resultados referentes a DQO não filtrada e concentração de lipídios no efluente do primeiro reator do sistema combinado (RELI) demonstraram que este reator realizou a hidrólise de parte dos lipídios, mas também funcionou efetivamente como uma caixa retentora de gordura. De acordo com o descrito no item 5.2.1, foram comparados os resultados de eficiência de remoção de matéria orgânica, considerando o efluente dos dois sistemas propostos.

Quanto à configuração de reator enzimático de leito expandido invertido proposta, foram observados vários aspectos negativos:

- Difícil operação, com demanda de tempo elevada para imobilização da enzima e substituição do leito.
- Necessidade de estrutura de laboratório de análises e instalações experimentais específicas.
- Geração de resíduos sólidos não biodegradáveis, devido ao descarte do leito do reator.

- Custo de instalação e operação muito elevado.
- Necessidade de mão de obra especializada.

Já o RAHLF não apresentou dificuldades operacionais durante o período monitorado, com ressalva para a quantificação do biogás gerado.

Esses resultados configuram um excelente desempenho do RAHLF₀₂, tornando a fase de pré-tratamento desnecessária na aplicação desta configuração de reator anaeróbio em sistemas de tratamento de águas residuárias à base de lipídios. Vislumbrando a hipótese de utilização de um RAHLF como unidade principal aplicado no tratamento deste composto específico, iniciou-se a avaliação do reator submetido a outras condições de operação.

5.3 . ETAPA III - OPERAÇÃO E MONITORAMENTO DE DUAS CONFIGURAÇÕES DE REATORES ANAERÓBIOS (RAHLF E UASB) SUBMETIDOS ÀS MESMAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO.

Na Etapa III, a pesquisa foi centrada em uma avaliação do comportamento do RAHLF em diferentes condições de operação, sendo contemplado, como foco de estudo, a otimização da variável de operação TDH.

Para validar a eficiência e estabilidade do RAHLF no tratamento específico da água residuária sintética utilizada neste trabalho, fez-se necessária a obtenção de informações sobre o comportamento de uma outra configuração de reator anaeróbio, alimentado com o mesmo afluente e operado em condições de operação próximas às impostas ao RAHLF. A configuração escolhida foi a de um reator de manta de lodo e escoamento ascendente (UASB). A escolha desse reator justifica-se no expressivo número de unidades em operação no Brasil. Segundo Andrade Neto e Campos (1999), o Brasil é o país no qual esse tipo de reator mais tem sido aplicado e evoluído tecnologicamente, sendo encontrados em quase todos os estados, com destaque para o Paraná, com mais de 200 unidades construídas.

A princípio, os reatores RAHLF e UASB seriam operados em tempos de detenção hidráulica de 24, 18, 12 e 8 horas. Devido ao desempenho apresentado pelo UASB, o mesmo foi operado durante apenas 18 dias, com um TDH de 24 horas. Já o RAHLF, foi operado de forma contínua, em cada um dos TDHs previamente programados, durante um período total de tempo de 98 dias.

5.3.1 . Comparação entre o Desempenho do RAHLF e do UASB, Alimentados com Água Residuária Contendo Lipídios

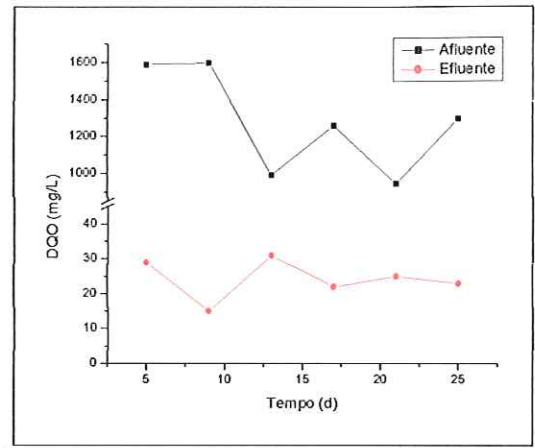
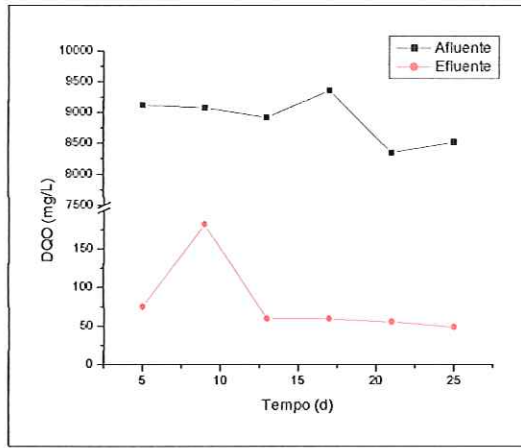
A avaliação do desempenho dos reatores anaeróbios RAHLF e UASB, foi realizada, caracterizando o efluente de cada reator, conforme parâmetros apresentados no item 4.13.

5.3.1.1 . Operação e monitoramento do RAHLF – Influência da Variável TDH na Eficiência da Remoção da Matéria Orgânica

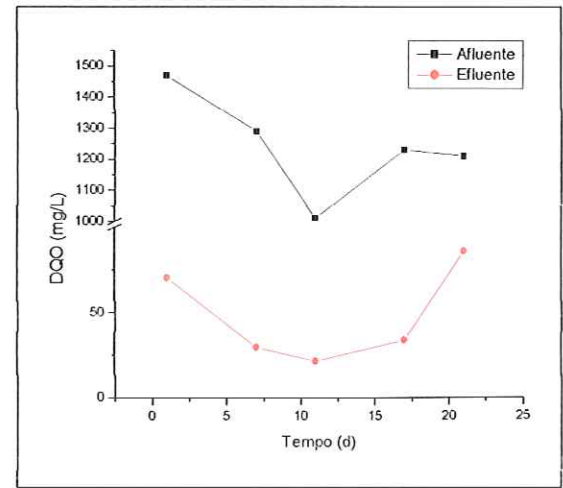
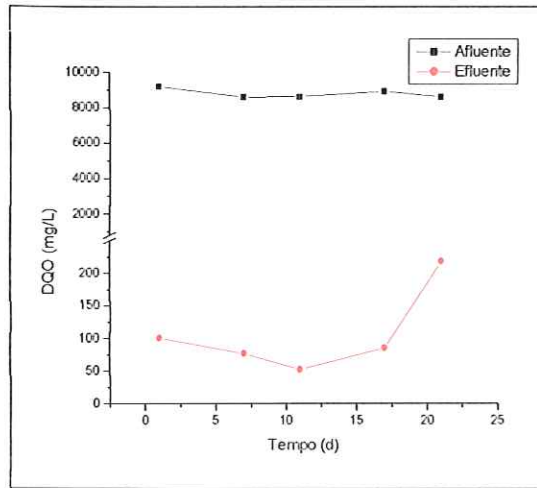
O RAHLF₀₃ apresentou bons resultados durante um período total de operação de 98 dias com redução progressiva do TDH. O reator foi monitorado com aplicação de TDH igual a 24 horas durante 29 dias, 18; 12 e 8 h durante 21; 26 e 22 dias, respectivamente. O RAHLF manteve-se estável durante o período de operação, apresentando diferença no comportamento hidrodinâmico durante a operação com TDH igual a 8 horas, passando a ser alimentado por bombeamento direto, em substituição à alimentação por gravidade.

A concentração de substrato afluente apresentou valores médios de DQO bruta e filtrada iguais a 8564 ± 544 mg/L e 1173 ± 261 mg/L, respectivamente; concentração de óleos e graxas de 1725 ± 24 mg/L; e concentração de lipídios de 1198 ± 70 mg/L.

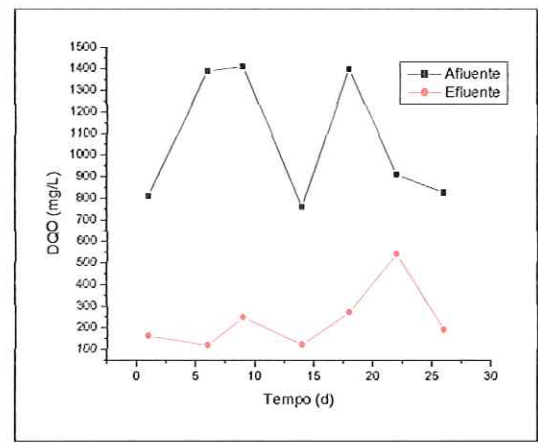
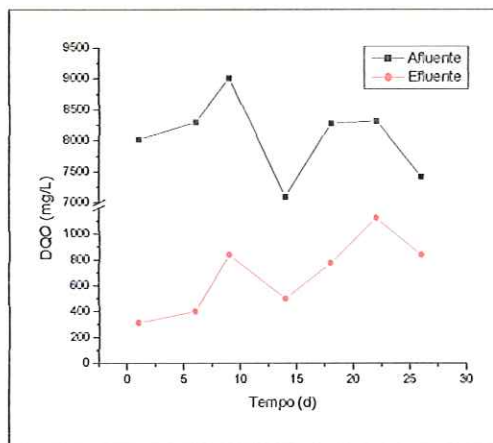
Os resultados apresentados nas Figuras 5.8, 5.9, 5.10 e 5.11, apresentam a variação de DQO no RAHLF, nos diferentes TDHs. A Figura 5.12 demonstra eficiências na remoção de DQO filtrada e bruta iguais a $99,7 \pm 0,1\%$ e $99,1 \pm 0,6\%$ para TDH igual a 24 horas; $99,4 \pm 0,3\%$ e $98,8 \pm 0,8\%$ para TDH igual a 18 horas, $97,0 \pm 1,7\%$ e $91,5 \pm 3,4\%$ para TDH igual a 12 horas e $96,0 \pm 0,8\%$ e $87,0 \pm 3,2\%$ para TDH igual a 8 horas, respectivamente.



a) b)
 Figura 5.8: Valores de DCO para TDH 24 horas no RAHLF₀₃. a) DCO bruta; b) DCO filtrada.



a) b)
 Figura 5.9: Valores de DCO para TDH 18 horas no RAHLF₀₃. a) DCO bruta; b) DCO filtrada



a) b)
 Figura 5.10: Valores de DCO para TDH 12 horas no RAHLF₀₃. a) DCO bruta; b) DCO filtrada.

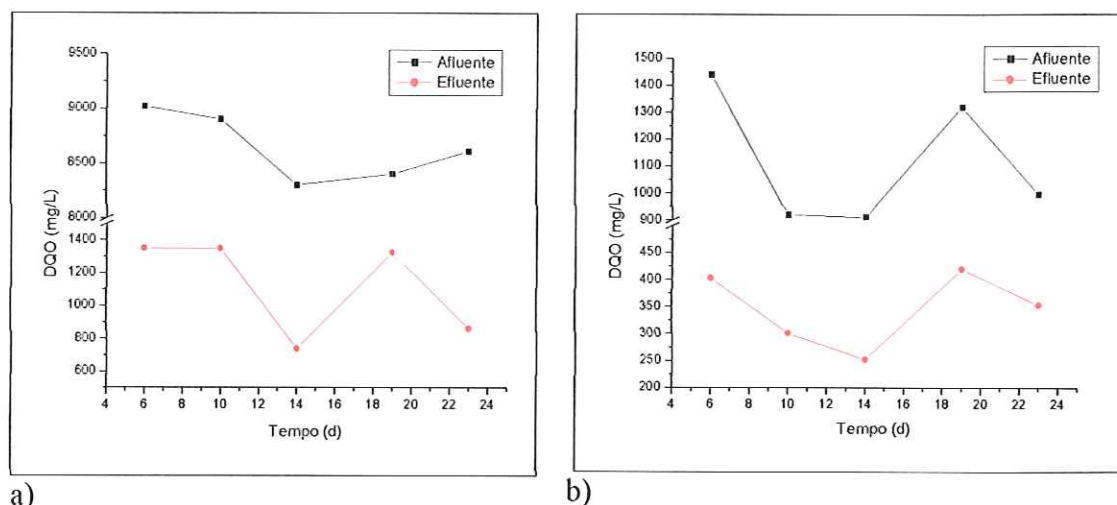


Figura 5.11: Valores de DCO para TDH 8 horas no RAHLF₀₃. a) DCO bruta; b) DCO filtrada.

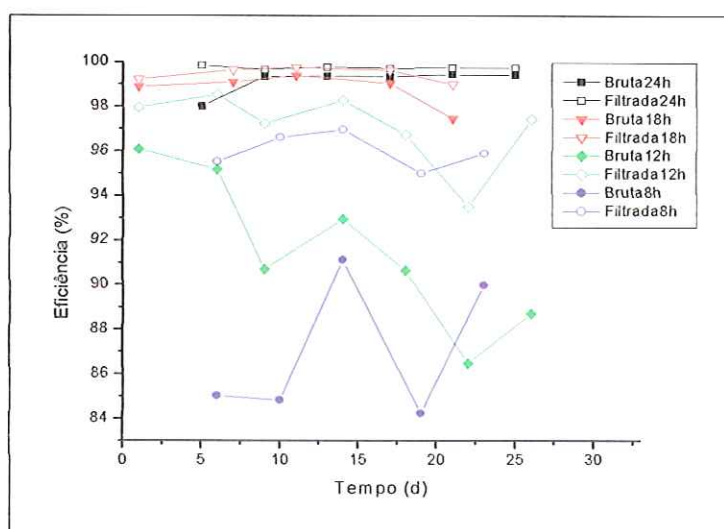


Figura 5.12: Eficiência de remoção de DCO bruta e DCO filtrada no RAHLF₀₃, para os diferentes TDH.

O pH do efluente do RAHLF manteve-se dentro de uma faixa de $7,5 \pm 0,3$, demonstrando a estabilidade no sistema.

A variação apresentada na concentração de sólidos do sistema teve o mesmo comportamento apresentado no item 5.2.2.6, mantendo-se estável durante a operação, não apresentando perda significativa de biomassa junto com o efluente.

Apesar das dificuldades da quantificação do volume de gás gerado, discutida no item 5.2.2.7, a concentração de metano foi de $2,03 \cdot 10^{10} \pm 2,89 \cdot 10^{10} \mu\text{mol/L}$, para TDH igual a 24 h; $4,14 \cdot 10^{10} \pm 1,45 \cdot 10^{10} \mu\text{mol/L}$ para TDH igual a 18 h; $3,50 \cdot 10^{10} \pm 1,93 \cdot 10^{10}$

$\mu\text{mol/L}$ para TDH igual a 12 h e $5,70 \cdot 10^{10} \pm 2,44 \cdot 10^{10}$ $\mu\text{mol/L}$ para TDH igual a 8 h. Os resultados da variação na concentração de metano são apresentados na Figura 5.13.

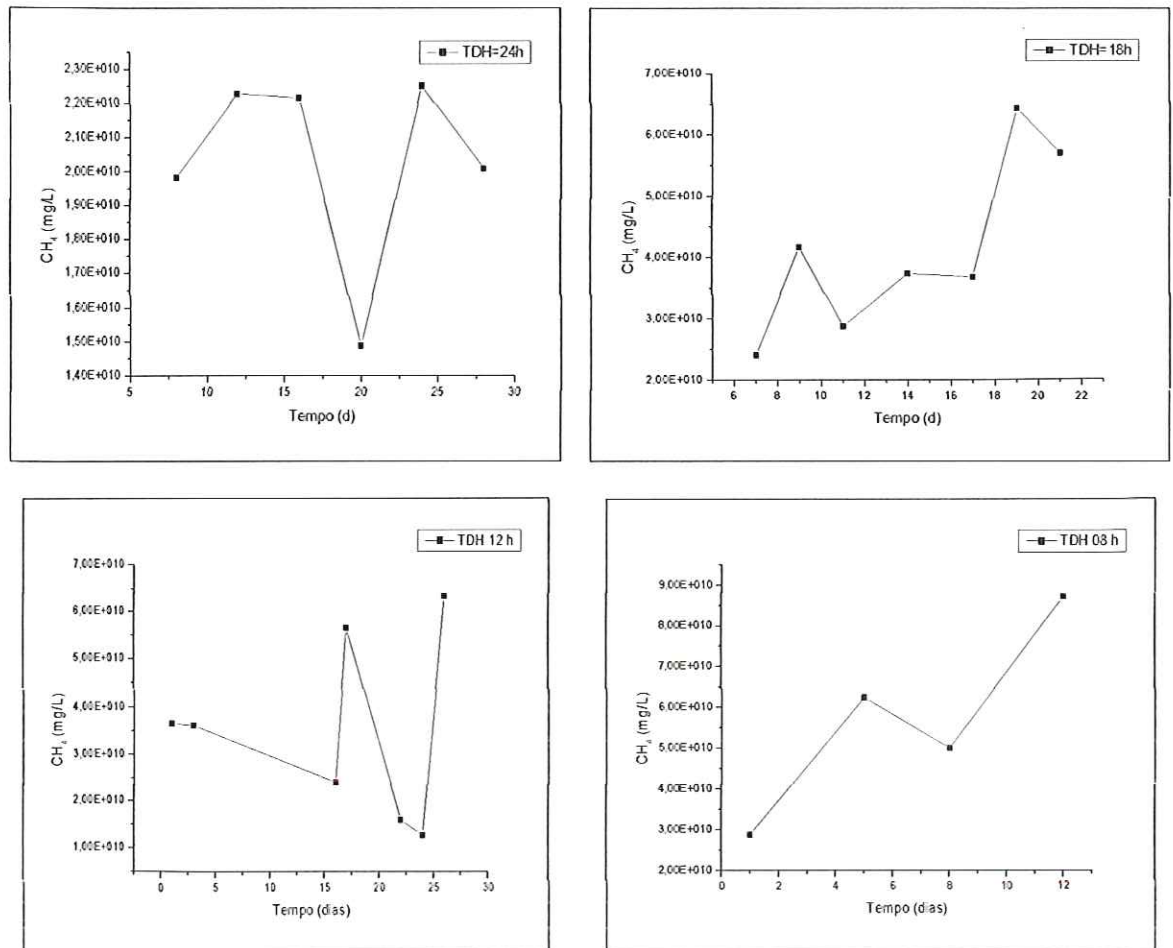


Figura 5.13: Variação da concentração de CH_4 , no RAHLF₀₃

A concentração de óleos e graxas no efluente apresentou valores médios de 49 ± 7 mg/L para TDH igual a 24 h, 73 ± 8 para TDH igual a 18 h; 126 ± 48 mg/L para TDH igual a 12 h; e 163 ± 47 para TDH igual a 8 h.

OMIL et al. (2003) empregaram um sistema combinado composto por filtro anaeróbio seguido de um reator aeróbio operado em bateladas seqüenciais. Os autores registraram a diminuição na concentração de óleos e graxas de 1800 mg/L para 200 mg/L. No referido trabalho, foi utilizado NaOH no tanque de alimentação do filtro aeróbio para correção do pH afluente, promoção da hidrólise dos lipídios, neutralização dos ácidos formados na hidrólise e manutenção da alcalinidade do meio. A concentração inicial de óleos e graxas utilizada por Omil et al. (2003) foi da mesma ordem de grandeza da utilizada no presente trabalho, porém o TDH aplicado ao filtro

anaeróbio, após atingir o equilíbrio dinâmico aparente, foi de 2,5 dias e tempo de reação de 24 horas no reator aeróbio em batelada. Embora em escala de bancada e alimentado com de lipídios de origem diferente, o RAHLF apresentou concentrações de óleos e graxas de 163 ± 47 mg/L, sendo operado com TDH igual a 8 horas, viabilizando assim a hipótese levantada de redução no TDH de reatores anaeróbios aplicados ao tratamento de águas residuárias contendo lipídios.

5.3.1.2 . Operação e Monitoramento do Reator UASB

Conforme justificativa apresentada no item 5.3, avaliou-se o comportamento do reator UASB sendo operado em condições similares às do RAHLF₀₃. O referido reator (UASB) não entrou em regime de equilíbrio aparente, devido à quase total flotação do lodo granular e acúmulo deste nos coletores de gás e topo do reator.

Já no sexto dia de operação, observou-se a flotação de parte do lodo granular. Essa operação teve um aumento progressivo com flotação de 85% da manta de lodo após dezoito dias de operação. A Figura 5.14 apresenta fotos do reator no 12º e 18º dias de operação, nas quais observa-se a formação de espuma e flotação do lodo granular. Tal comportamento desenvolveu-se provavelmente devido à adsorção dos lipídios nos grânulos do lodo e à formação de espuma. O comportamento desse reator, corrobora com as considerações de Salminen e Rintala (2002), quando citam que o um grande problema causado pelo acúmulo de ácidos graxos é a formação de espumas. De acordo com Petruy e Lettinga (1997), a flotação dos grânulos em reatores anaeróbios utilizados no tratamento de águas residuárias contendo lipídios, ocorre devido à dificuldade de liberação dos gases produzidos pelo lodo granular. A eficiência de remoção de matéria orgânica representada pelos parâmetros DQO e lipídios, apresentada nas Figuras 5.15 e 5.16, resulta principalmente de fenômenos adsorptivos e acúmulo de lipídios na manta de lodo. A quase total flotação da manta de lodo configurou uma falência total do sistema.

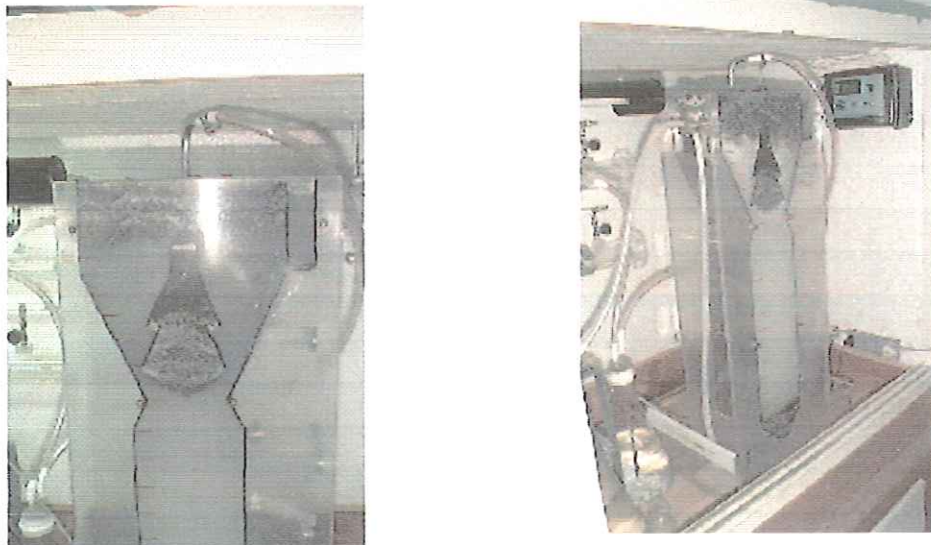


Figura 5.14: Foto do reator UASB: a) após 12 dias de operação; b) 18 dias de operação

O desempenho apresentado pelo reator UASB reforça a maior confiabilidade e eficiência apresentada pelo RAHLF operando no tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios. Cabe ressaltar que ao término da Etapa II da fase experimental (100 dias de operação; TDH = 24h), o RAHLF permanecia em pleno equilíbrio aparente, não apresentando problemas operacionais.

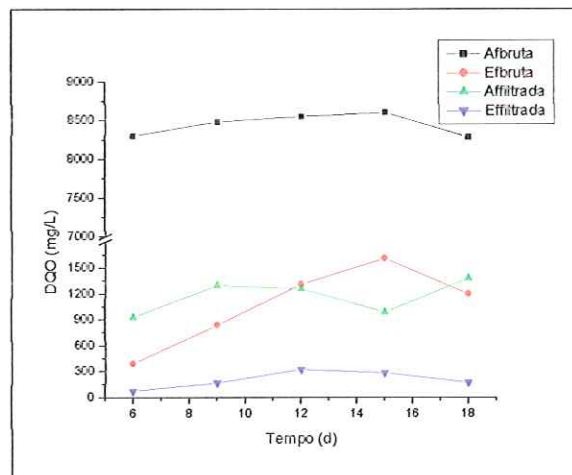


Figura 5.15: Variação da DCO do reator UASB

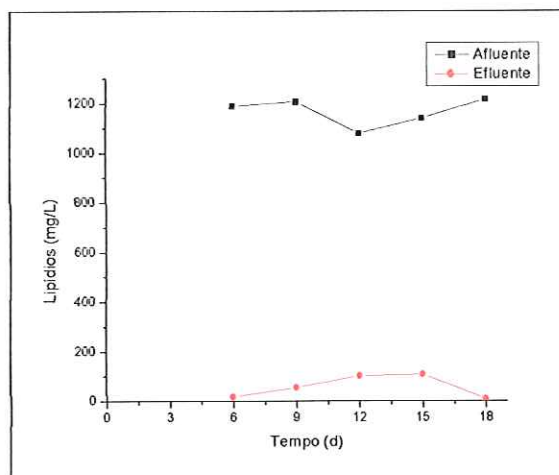


Figura 5.16: Variação da concentração de lipídios do reator UASB

Um dos problemas observados durante a formação de espuma e flotação do lodo foi a formação de bolsões de gás na monta de lodo. Este fato impossibilitou a quantificação do gás gerado no reator UASB, sendo encontrado na composição do gás $2,13 \cdot 10^9 \pm 5,81 \cdot 10^8 \mu\text{mol/L}$ de CH_4 durante os dezoito dias de operação.

Segundo Speece (1996), um reator anaeróbio deve ser operado em faixa de pH variando entre 6,5 e 8,2, sendo possível uma operação satisfatória em pH de até 6. Os resultados de variação temporal de pH, demonstraram que o UASB manteve-se com valores dentro do esperado para um reator em condições de equilíbrio, variando entre 6,9 e 7,3. De acordo com Foresti et al. (1999), no processo de digestão anaeróbia, caso sejam mantidos no reator as fases de acidogênese e metanogênese em equilíbrio, o pH no meio deverá ser mantido próximo ou levemente superior a 7,0. Mesmo apresentando condições favoráveis de faixa de variação de pH, não seria possível referir-se a um equilíbrio aparente no reator, pois o breve período de operação e a falência do sistema com a flotação de 85% do lodo granular demonstraram a fragilidade do UASB operado sob as condições previamente definidas.

5.3.2 . Avaliação do Material Formado nos Interstícios da Espuma de Poliuretano por EDX e por Absorção Atômica

Conforme visto no item 3.5.1, o acúmulo de AGCLs pode causar problemas na digestão anaeróbia por serem tóxicos aos microrganismos anaeróbios. Segundo HWU et al. (1998), os AGCLs podem se tornar inibidores aos microrganismos anaeróbios, em

concentrações milimolares. De acordo com Hanaki et al. (1981) e Roy et al. (1985), os íons cálcio presentes no meio reagem com os ácidos graxos formando precipitados.

Hanaki et al. (1981) verificaram que a adição de CaCl_2 induziu à redução da inibição causada pelos AGCLs, quando a cultura de microrganismos não foi exposta por mais de algumas horas ao efeito tóxico causado pelos ácidos. A adição de íons cálcio reduziu a fase lag do crescimento microbiano (fase de adaptação) devido à formação de compostos insolúveis (Ca-AGCLs). O precipitado formado reduziu o efeito de inibição, pois diminuiu a concentração de ácidos graxos livres, facilitando a adsorção dos ácidos pela parede celular microbiana, aumentando, assim, a eficiência na remoção de matéria orgânica no sistema. Segundo os autores, os resultados positivos apresentados pela adição de CaCl_2 não foram obtidos em experimentos realizados com CaCO_3 , justificado pela solubilidade do primeiro composto em água, e pela não solubilidade do carbonato.

A água residuária sintética utilizada no presente trabalho apresentava concentração de CaCl_2 igual a 23,5 mg/L e os resultados de EDX indicaram a presença de 86,66% de cálcio no material formado nos interstícios das partículas de espuma de poliuretano. Por meio de análises de absorção atômica, caracterizou-se a presença de cálcio, à concentração de 3,14 mg/L, nas amostras do material coletado no RAHLF₀₃. A formação deste material precipitado pode ter inibido os efeitos tóxicos dos AGCLs na biomassa presente no reator, apresentando-se como uma das justificativas do bom desempenho do RAHLF.

Embora o reator UASB tenha sido alimentado com a mesma água residuária sintética, as características dos grânulos de microrganismos imobilizados por meio de auto-adesão facilitam a ocorrência de flotação devido a fenômenos adsortivos de lipídios, com conseqüente redução na densidade dos grânulos, fato este que não ocorreu no RAHLF, devido à imobilização da biomassa presente em meio estacionário.

A análise de EDX da amostra da “escuma” formada no topo do UASB, era constituída de 22,2% de cálcio, sendo obtida, por meio da análise de absorção atômica, a concentração de 1,8 mg/L de cálcio. Segundo Hwu et al. (1998), a ocorrência de fenômenos adsortivos dos AGCLs no leito granular resulta em concentrações desses compostos inferiores às concentrações tóxicas aos microrganismos, tornando assim a toxicidade um efeito secundário. O referido corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, no qual os efeitos adsortivos dos AGCLs e a formação de espuma provocaram a flotação da manta de lodo, antes da entrada do reator em equilíbrio dinâmico aparente.

5.4. AVALIAÇÃO CINÉTICA DO PROCESSO ANAERÓBIO DE CONVERSÃO

A observação de bases racionais na avaliação do comportamento de reatores anaeróbios é de fundamental importância para obtenção de parâmetros para projetos e operações.

A proposta de estudos cinéticos nos resultados apresentados pelos perfis espaciais de concentração de lipídios e concentração de ácidos voláteis do RAHLF operando em TDHs de 24, 18, 12 e 8 h, pode auxiliar no entendimento do processo. Esses parâmetros podem ser utilizados para melhoria da estabilidade do reator e otimização da variável TDH.

De acordo com De Nardi et al. (1999), o RAHLF apresenta características de um reator tubular ideal. Considerando reator tubular ideal e cinética de primeira ordem, o balanço de lipídios em sistema pseudo-homogêneo resultou na Equação 5.2.

$$R_{obs} = \frac{-\varepsilon \cdot v_s}{D} \cdot \frac{dC_L}{d(L/D)} \quad (5.2)$$

Na Equação 5.2, R_{obs} é a velocidade global de conversão de lipídios, ε é a porosidade do leito (igual a 0,4 em todos os experimentos); L é o comprimento do reator; e D é o diâmetro (igual a 5 cm) e v_s é a velocidade superficial de líquido no leito.

Integrando a Equação 5.2 chega-se a Equação 5.3.

$$C_L = C_{LR} + (C_{L0} - C_{LR}) e^{-\left(\frac{k_1^{app} \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s}\right)(L/D)} \quad (5.3)$$

Nesta equação, C_L é a concentração de lipídios, C_{L0} a concentração inicial de lipídios, k_1^{app} é a constante cinética aparente de primeira ordem e C_{LR} é a concentração residual de lipídios, inserida na equação de balanço, pois, de acordo com os resultados dos experimentos, a concentração de lipídios não tendeu a zero, mas sim a um valor limite, aqui denominado C_{LR} .

A equação de balanço (5.3) foi ajustada aos perfis de concentração de lipídios ao longo do reator para cada experimento realizado com diferentes tempos de detenção hidráulica. Dos ajustes, realizados por regressão não linear (Método de Levenberg-

Marquardt - Software Microcal Origin 5.0[®]), foram obtidos os valores de k_1^{app} e de C_{LR} , apresentados na Tabela 5.6 e na Figura 5.17.

Pode ser observado o aumento de k_1^{app} com aumento de v_s , indicando que efetivamente a diminuição da resistência à transferência de massa na fase líquida, afetou positivamente a velocidade global de conversão dos lipídios. O aumento de v_s em leitos fixos promove a diminuição da camada limite de líquido ao redor de uma biopartícula, resultando no aumento da velocidade de transferência de massa na fase líquida e, conseqüentemente, no aumento da velocidade global de conversão.

Tabela 5.6: Parâmetros cinéticos do processo de conversão de lipídios.

TDH (h)	v_s (m/h)	k_1^{app} (h ⁻¹)	C_{LR} (mg/L)
8	0,31	1,46	117 ± 2
12	0,21	0,73	170 ± 1
18	0,14	0,70	92,0 ± 0,1
24	0,10	0,40	22,0 ± 0,2

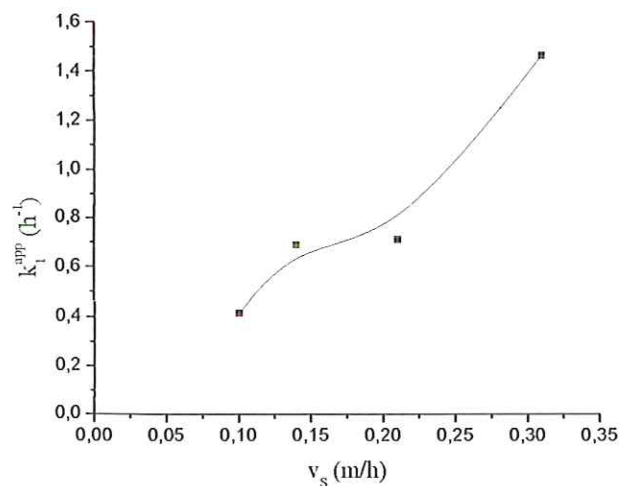


Figura 5.17: Variação de k_1^{app} com a velocidade superficial de líquido

A concentração residual de lipídios é resultado de um balanceamento entre os efeitos de aumento da velocidade de transferência de massa na fase líquida (aumento da velocidade superficial de líquido) e da diminuição do tempo de detenção hidráulica. Foi observado aumento de concentração residual de lipídios (C_{LR}) a medida em que foi

diminuindo o TDH de 24 para 12 h. No entanto, para TDH de 8 h, houve diminuição de C_{LR} em relação ao TDH de 12 h, provavelmente pelas condições mais satisfatórias de transferência de massa na fase líquida.

A velocidade de conversão de lipídios (R_s) foi calculada utilizando-se a equação (5.4):

$$R_s = k_1^{app} \cdot (C_L - C_{LR}) \quad (5.4)$$

Os resultados apresentados na Figura 5.18 demonstram que as maiores velocidades de conversão de lipídios foram obtidas para operação com TDH de 8 h e as menores para TDH de 24 h pelos motivos já expostos. De qualquer forma, em todas as operações, a velocidade de reação foi desprezível para L/D maior que 8.

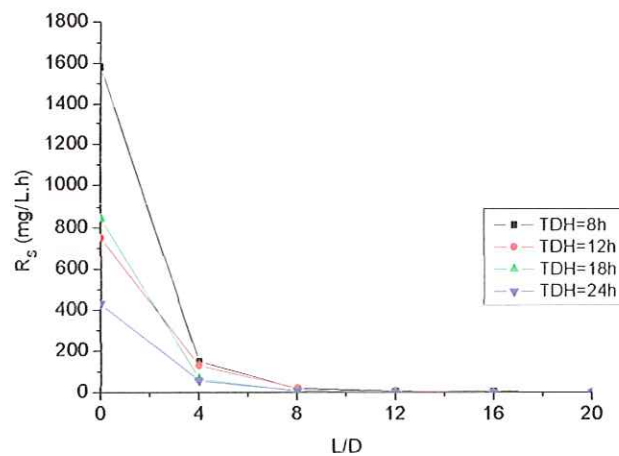


Figura 5.18: Velocidade de conversão de lipídios em função da relação L/D

Os resultados analíticos indicaram conversão predominante de lipídios em ácidos acético e propiônico. Com base nos perfis espaciais obtidos, foi proposto um modelo cinético de reações paralelas de primeira ordem com o objetivo de avaliar as rotas de degradação dos lipídios em cada condição experimental. A Figura 5.19 apresenta o diagrama do modelo proposto de degradação dos lipídios. Nesta representação, k_{1A}^{app} e k_{1B}^{app} são as constantes cinéticas aparentes do processo descrito. Essas constantes foram estimadas a partir da expressão de balanço de massa utilizando algoritmo de otimização, baseado na técnica de gradientes reduzidos generalizados

(Microsoft EXCEL® 2000 - SOLVER). Os perfis temporais experimentais, obtidos para cada condição, são apresentados na Figura 5.20.

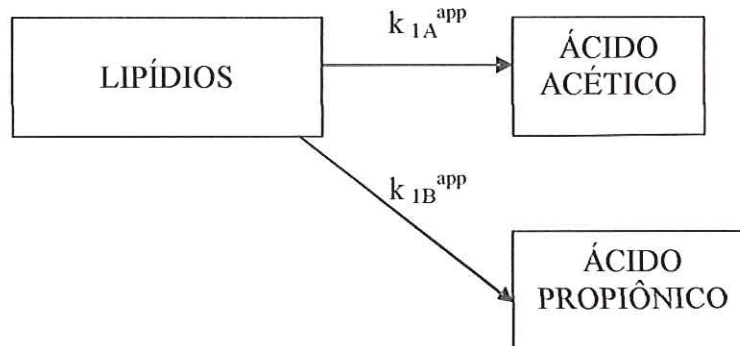


Figura 5.19: Mecanismo cinético simplificado proposto para degradação anaeróbia de lipídios no RAHLE.

Os valores de k_{1A}^{app} e de k_{1B}^{app} foram obtidos para cada condição experimental e foram utilizados para avaliação das rotas preferenciais de degradação dos lipídios. A relação dessas duas constantes com a constante global k_1^{app} indica qual a via de degradação em cada condição operacional. Os resultados dessa análise são apresentados na Tabela 5.7.

Foi observado que a diminuição do TDH (aumento de v_s) causou o aumento crescente da relação entre ácido acético e ácido propiônico, produzidos via degradação de lipídios. Com TDH de 24 h foi produzido somente ácido propiônico via degradação de lipídios enquanto que, para TDH de 8 h, 84% do lipídio degradado foi transformado em ácido acético e apenas 16% em propiônico.

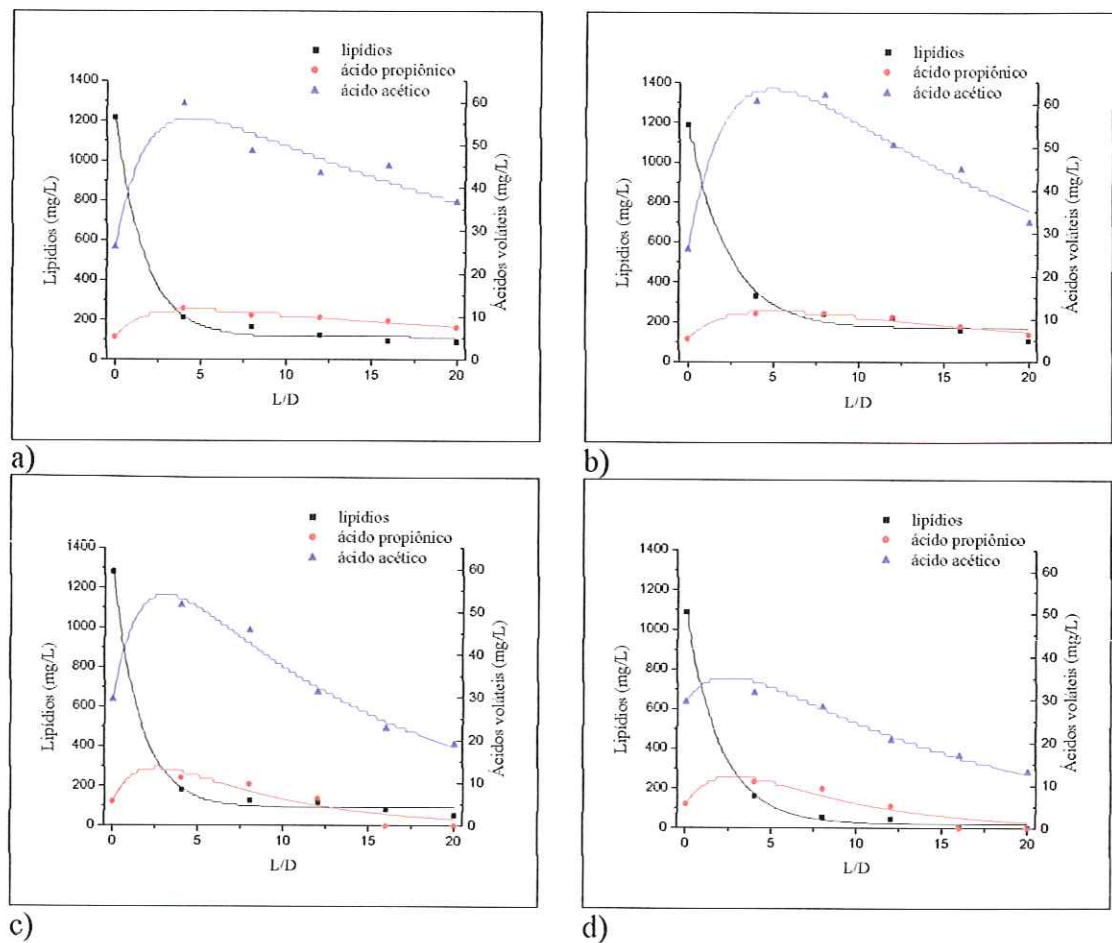


Figura 5.20: Perfis espaciais de consumo de substrato e produção e consumo de metabólitos intermediários ao longo do comprimento do RAHLF: Lipídios (■); ácido acético (▲); ácido propiônico (●); modelo (—); a) TDH = 8h; b) TDH = 12h; c) TDH 18 h; d) TDH 24 h

Tabela 5.7: Porcentagens de conversão de lipídios em ácido acético e ácido propiônico, em função do TDH

TDH (h)	Ácido Acético (%)	Ácido Propiônico (%)
8	84	16
12	12	88
18	2	98
24	≅ 0	≅ 100

Deve-se ressaltar que, embora a produção de ácido acético tenha sido baixa via conversão de lipídios, a concentração desse ácido nessas condições é representativa (Figura 5.20). Isso ocorre porque o ácido propiônico é convertido a ácido acético após ser produzido via degradação de lipídios.

O comportamento apresentado de conversão de lipídios em ácido acético e ácido propiônico, em função do TDH, está relacionado com o aumento da velocidade de

transferência de massa, o que provavelmente resultou na melhoria no balanceamento do processo anaeróbio, com utilização efetiva da biomassa aderida à partícula. Nessa hipótese considerou-se que quanto menor o TDH, maior a velocidade de transferência de massa e maior o acesso dos lipídios ao interior das partículas com biomassa imobilizada. Essa hipótese requer a realização de mais experimentos para validação.

5.5. EXAMES MICROBIOLÓGICOS E ANÁLISES DE BIOLOGIA MOLECULAR

5.5.1 . Caracterização Microbiológica

Amostras da biomassa proveniente das espumas de poliuretano foram examinadas por microscopia óptica após 30 dias de operação e ao final do experimento (100 dias de operação). Nas duas condições avaliadas, os exames microscópicos revelaram o predomínio de arqueas metanogênicas semelhantes a *Methanosaeta* sp. e bacilos delgados fluorescentes provavelmente pertencentes a família Methanobacteriaceae. É importante ressaltar que em reatores anaeróbios, principalmente em RHALFs com matrizes de poliuretano imobilizadas, as arqueas metanogênicas acetoclásticas, tais como *Methanosaetha* utilizam o acetato como o principal doador de elétrons convertendo-o a metano e dióxido de carbono (VARESCHE *et al.*, 1997). Entre as bactérias, observou-se o predomínio de bacilos retos com extremidades arredondadas e vibrios, provavelmente relacionados às bactérias redutoras de sulfato (BRS) e semelhantes a *Desulfovibrio* sp., além da presença de bacilos retos com grânulos intracelulares, espirilos e cocos. De acordo com Oude Elferink *et al.* (1994), algumas BRS podem degradar completa ou incompletamente compostos como ácidos graxos de cadeias longas e ramificadas. Neste trabalho, devido às baixas concentrações de sulfato (0,5mg/L de NiSO₄.6H₂O e 2,5mg/L de FeSO₄.7H₂O provenientes do substrato sintético), as BRS semelhantes a *Desulfovibrio* sp realizaram o metabolismo fermentativo do substrato orgânico. Provavelmente, tais microrganismos cresceram em associação sintrófica com as arqueas metanogênicas hidrogenotróficas semelhantes a *Methanobacterium* sp e *Methanobrevibacter* sp, as quais utilizam o hidrogênio como principal doador de elétrons durante a metanogênese. Portanto, as condições operacionais e ambientais dos reatores favoreceram a metanogênese e a fermentação do

substrato orgânico por culturas sintróficas. A ocorrência e as morfologias observadas ao longo do reator estão apresentadas na Tabela 5.8 e Figuras 5.21 e 5.22.

Tabela 5.8: Ocorrência e morfologias observadas ao longo do RHALF.

MORFOLOGIAS	PONTOS			
	1	2	3	4
Arqueas metanogênicas				
<i>Methanosarcina</i> sp.	++	-	-	-
<i>Methanosaeta</i> sp.	++++	++++	+++	+++
Cistos de sarcina	+	+	+	+
Bacilos fluorescentes	++++	++++	+++	+++
Bactérias				
Bacilos com extremidades arredondadas	++++	++++	+++	+++
Cocos	++	++	+	+
Espirilos	-	++	++	++
Víbrios	+++	+++	++++	++++

(++++) predominantes, (+++) freqüentes, (++) pouco freqüentes, (+) raros.

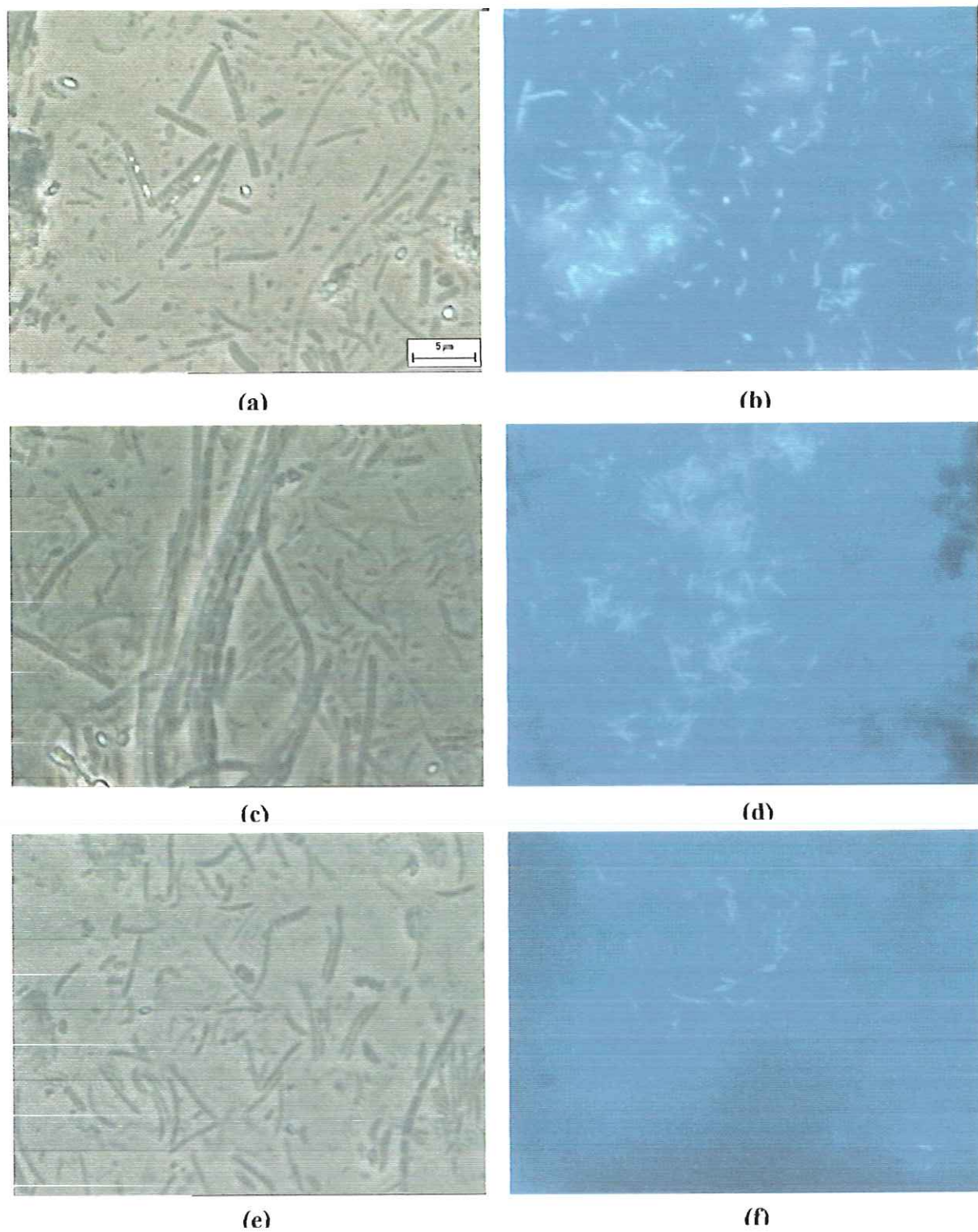


Figura 5.21: Morfologias observadas no início de operação do RHALF. Microscopia óptica de contraste de fase (a, c, e) e microscopia de fluorescência (b, d, f). Aumento de 1500x.

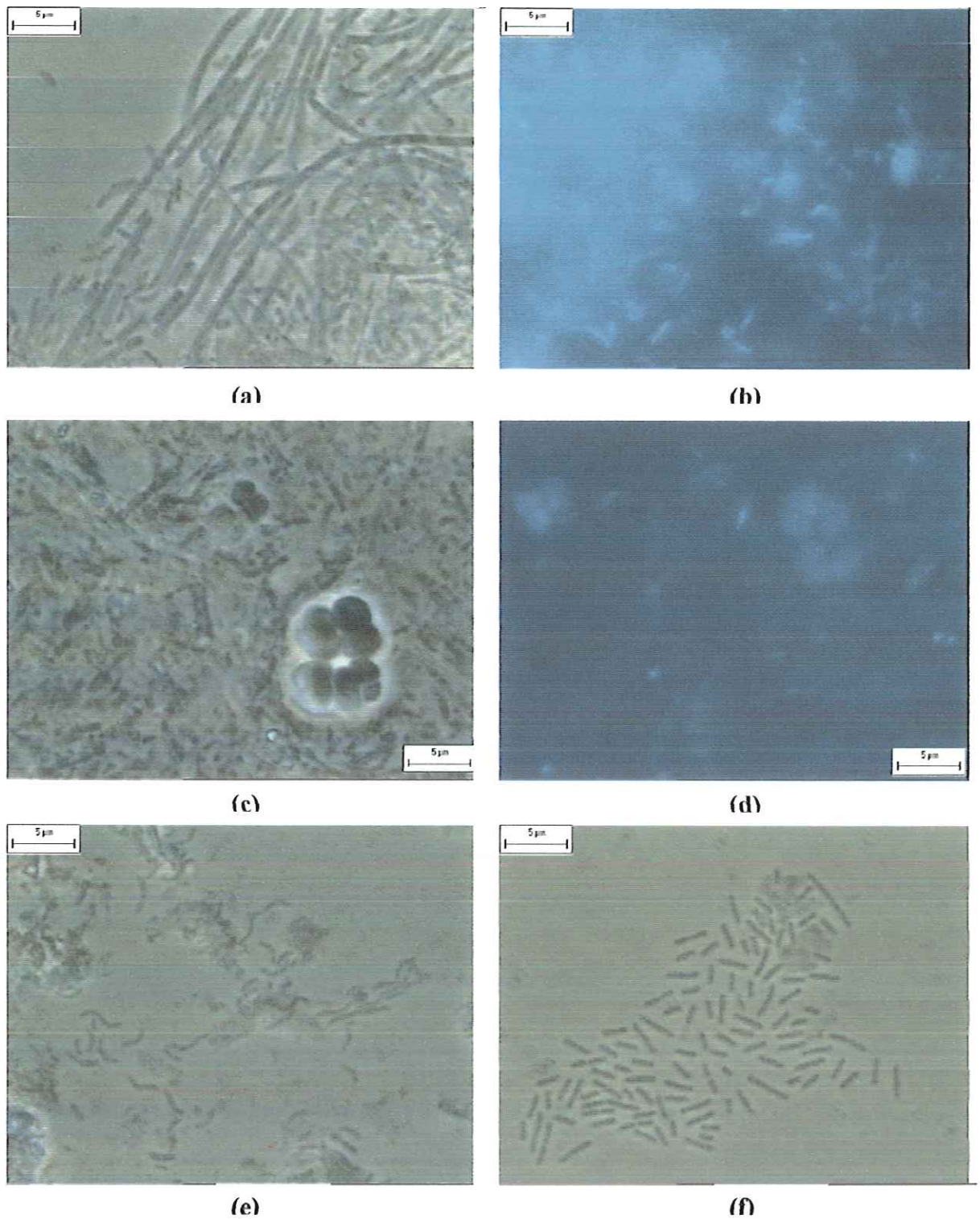


Figura 5.22: Morfologias observadas no final de operação do RHALF. Microscopia óptica de contraste de fase (a, c, e) e microscopia de fluorescência (b, d, f). Aumento de 1500x.

5.5.2 . Análise da Estrutura e Diversidade Microbiana através da Técnica de PCR/DGGE

A técnica do PCR/DGGE avalia a estrutura da comunidade microbiana presente nos nichos ecológicos. A análise da estrutura da comunidade microbiana foi realizada no lodo anaeróbio dos RAHLFs do sistema combinado e controle (Etapa II) e RAHLF₀₃ (Etapa III), ao longo do comprimento dos reatores. O resultado desta análise está apresentado na Figura 5.22. As amostras da condição “A” A.1 e A.4, referem-se ao material coletado nos pontos de amostragem alocados nas posições L/D igual a 4 e 20 do RAHLF₀₁ do sistema combinado, sendo as amostras a.1 e a.4 retiradas dos referidos pontos de amostragem, porém do RAHLF₀₂ operado como controle. As amostras da condição “B”, B.1, B.2, B.3 e B.4, representam os pontos de amostragem de L/D igual a 4, 8, 12 e 16 respectivamente, do RAHLF₀₃ empregado na Etapa III.

Nestes procedimentos, utilizou-se *primers* para o Domínio *Bacteria* (968FGC e 1392R) e (1100FGC e 1400R) para o Domínio *Archaea*. Os perfis das bandas padrão do DGGE estão apresentados na Figura 5.23.

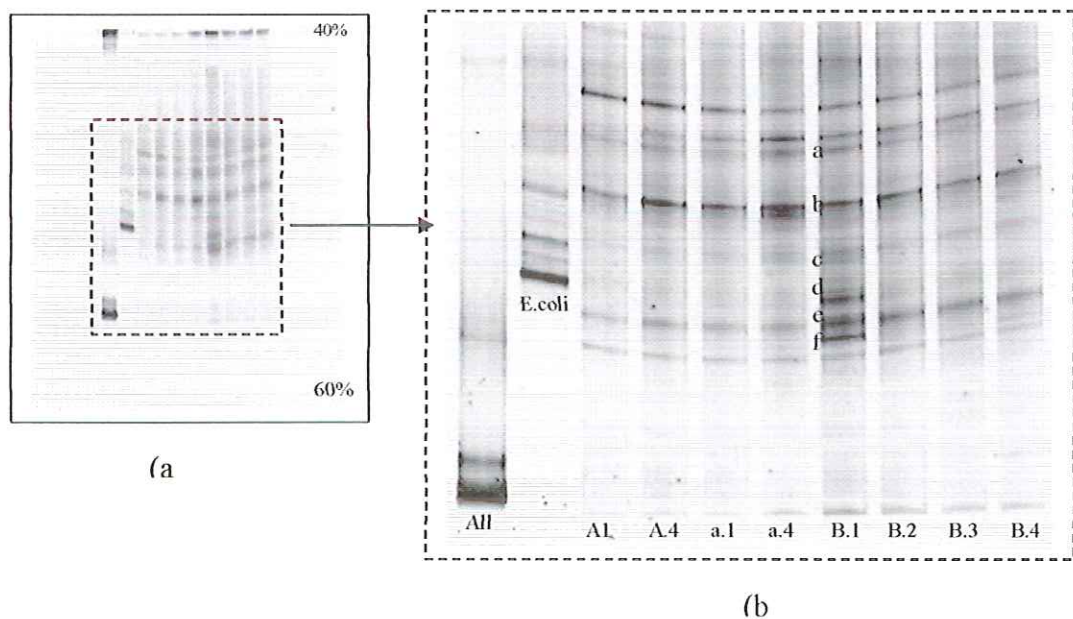


Figura 5.23: Perfil das bandas padrão do DGGE dos fragmentos do DNAr 16S amplificados com *primers* 968FGC e 1392R (*Bacteria*). (a) gel inteiro (b) aumento da área marcada. *All* = *Allochromatium vinosum* (DSM 183); *E.coli* = *Escherichia coli*.

A partir do perfil das bandas padrão do gel de DGGE apresentado na Figura 5.23, verificou-se que a diversidade genética da condição “A” foi similar, indicando que as mesmas populações estavam presentes nos dois reatores, RAHLF₀₁ e RAHLF₀₂.

A estrutura da comunidade microbiana da condição B, referente ao RAHLF₀₃ (Etapa III), demonstrou que a amostra do ponto B.1 era mais complexa, quando comparado aos demais pontos de amostragem alocados ao longo do comprimento do reator. Isso pode ser verificado pelas bandas (a), (b), (c), (d), (e) e (f) que são mais expressivas nesse ponto, indicando que essas populações foram maiores. Verificou-se também que as bandas (d) e (f) quase desapareceram, ou seja, essas populações foram praticamente eliminadas ao longo do reator. Este resultado que evidencia maior população microbiana no ponto de amostragem inicial do reator, seguido de diminuição da comunidade em função do aumento do comprimento do reator, possivelmente está relacionado com a diminuição da concentração de matéria orgânica disponível conforme apresentado no item 5.4. Os resultados dos RAHLFs da condição A, não apresentaram uma diferença significativa de comunidades microbianas amostradas em diferentes posições ao longo do comprimento dos reatores ($L/D = 4$ e 16). O perfil de concentração de matéria orgânica, expressa na forma de DQO dos reatores referidos anteriormente, também apresentou comportamento de diminuição ao longo do comprimento do reator. A diferença entre as duas condições de operação dos reatores foi a carga orgânica volumétrica aplicada. Na condição A, os reatores foram operados durante 100 dias com um TDH de 24 horas. Já na condição B, o reator foi operado durante 98 dias, porém com diminuição do TDH de 24, 18, 12 e 8 horas, o que resultou em um volume maior de material processado.

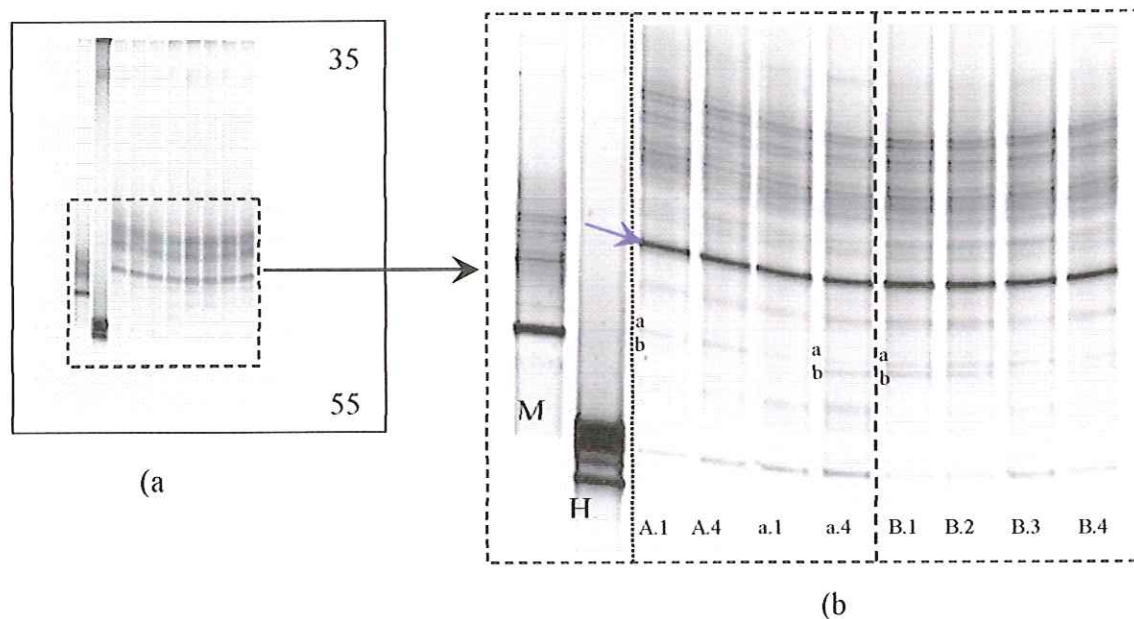


Figura 5.24: Perfil das bandas padrão do DGGE dos fragmentos do DNAr 16S amplificados com *primers* 1100FGC e 1400R (*Archaea*), utilizando amostras de reatores RAHLF. (a) gel inteiro (b) aumento da área marcada (M.f.=*Methanobacterium formicicum* (ATCC 33274); H.s.=*Halobacterium salinarum* (DSM 668)).

O perfil das bandas padrão de DGGE, apresentado na Figura 5.24 mostrou que as estruturas das comunidades microbianas foram praticamente similares, com exceção das bandas (a) e (b). Como pode ser observado na condição “A”, a banda (a) mostrou-se um pouco mais expressiva nas amostras do RAHLF₀₁, enquanto que a banda (b) tornou-se mais nítida na amostra a.4 do RAHLF₀₂. Na condição B, a banda (a) persistiu nas amostras dos quatro pontos dispostos ao longo do comprimento do reator, e a banda (b) também se manteve, com exceção da amostra B.3. A banda indicada pela seta, pode estar relacionada com a presença dos bacilos fluorescentes, observada com muita frequência nos exames microscópicos.

5.5.3. Contagem e Caracterização dos Microrganismos Anaeróbios Presentes no RAHLF por meio das Técnicas de Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH)

Amostras da biomassa aderida nas espumas de poliuretano, provenientes dos RHALFs, foram submetidas a técnica de FISH. No entanto, não foi possível realizar a contagem das células, pois estas encontravam-se aderidas a biopolímeros dificultando a caracterização e quantificação das mesmas (Figura 5.25).

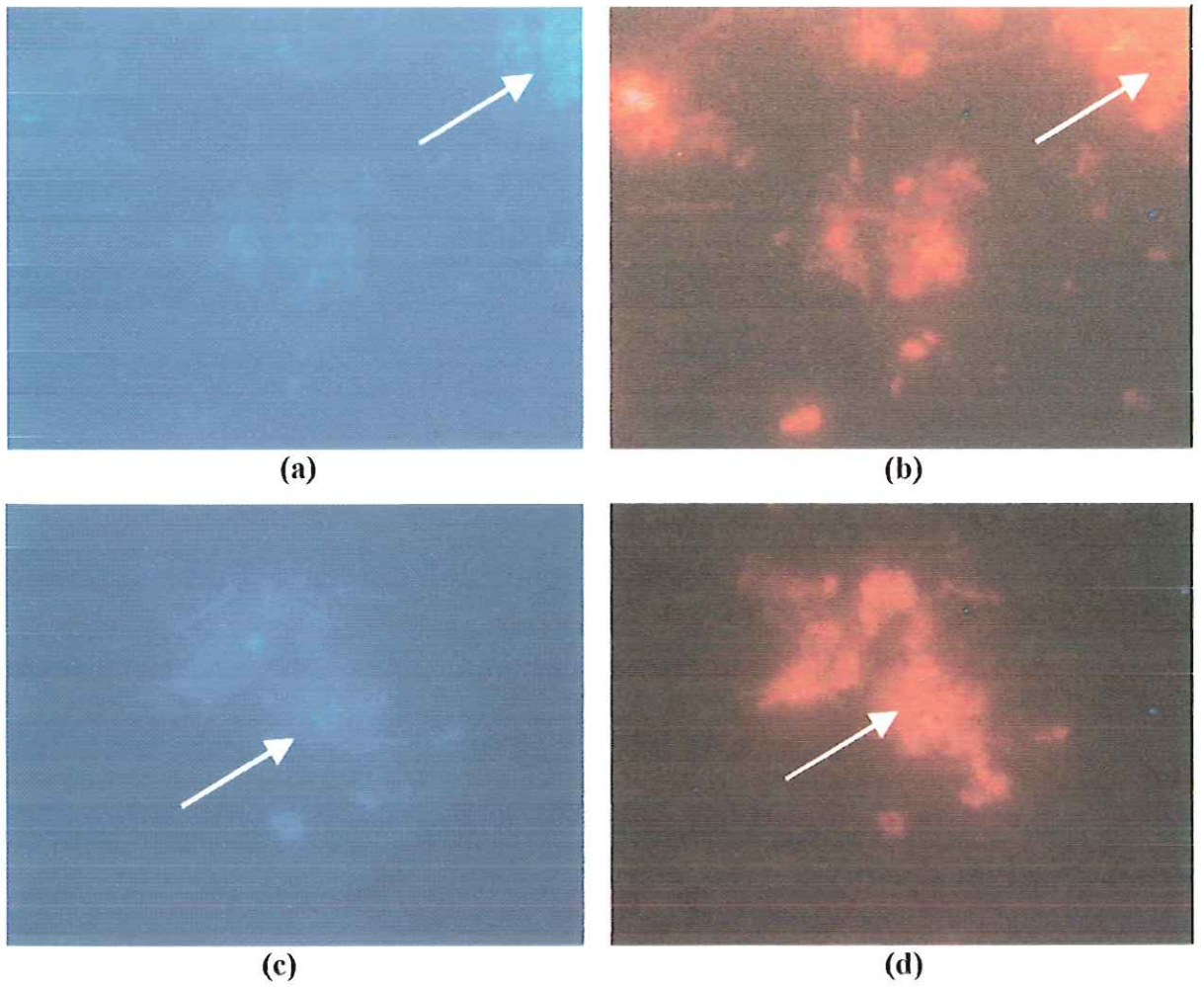


Figura 5.25: Células coradas com DAPI (a, c). Células coradas com a sonda EUB338 (b,d). As setas indicam células aderidas a biopolímeros.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados obtidos na realização deste trabalho permitem apresentar as seguintes conclusões:

- A concentração da solução enzimática padrão utilizada na imobilização das lipases que apresentou os melhores resultados para aplicação no pré-tratamento da água residuária à base de lipídios foi a de 0,6% (v/v). Com essa solução obteve-se melhor relação entre a concentração de solução enzimática disponibilizada para imobilização e a massa de suporte.
- A configuração de reator enzimático (RELI) proposta como alternativa de pré-tratamento apresentou várias dificuldades operacionais, como obstrução dos distribuidores de fluxo, necessidade de substituição diária do leito do reator, e rotina exaustiva de procedimentos de imobilização da enzima.
- Os resultados apresentados pelos dois sistemas de tratamento (RELI-RAHLF₀₁ e RAHLF₀₂) foram similares, com eficiência de remoção de DQO e lipídios expressos em concentração de O & G de $99,0 \pm 0,3\%$ e $94,9 \pm 3,2\%$ e $98,9 \pm 0,4\%$ e $94,2 \pm 2,8\%$.
- Os possíveis fatores do bom desempenho apresentado pelo RAHLF foram as suas características de elevada relação biomassa-suporte; imobilização do lodo em meio suporte estacionário inerte; fluxo horizontal com comportamento aproximado de um plug-flow; e a presença de CaCl₂ no substrato, resultando em precipitação de parte dos AGCLs, com inibição aos efeitos tóxicos destes.
- A avaliação cinética do processo anaeróbio de conversão de lipídios demonstrou que a diminuição do TDH aplicado ao RAHLF, embora tenha aumentado a concentração de lipídios residual, aumentou a velocidade de degradação pela redução da transferência externa de massa externa.
- O reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) não entrou em regime dinâmico aparente, configurando falência do sistema após 18 dias de operação devido à flotação de 85% do lodo granular.

- O bom desempenho do Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) aplicado ao tratamento de água residuária com alta concentração de lipídios apresenta uma potencial indicação deste reator como unidade principal de tratamento deste tipo de efluente, devido à performance similar à observada no sistema integrado enzimático-anaeróbico.

Diante dos resultados obtidos e das dificuldades encontradas durante esta pesquisa, são feitas as seguintes sugestões para futuros trabalhos:

- Avaliação do RAHLF aplicado no tratamento de águas residuárias à base de lipídios oriundos de diferentes fontes.
- Caracterização quali-quantitativa do material formado nos interstícios das espumas de poliuretano.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DURI, B.; YONG, Y.P. (2000). Lipase immobilization: an equilibrium study of lipases immobilized on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochemical Engineering Journal*, v.4, p.207-215.

ALVES, M.M.; ALVARES PEREIRA, R.M.; MOTA VIEIRA, J.A.; MOTA, M. (1997). Effect of lipids on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors treating a synthetic dairy waste. In: Proceedings of the International Symposium of Environmental Technology, Part II, Oostende, Belgium, 21-24 April, p.521-524,.

ALVES, M.M.; VIEIRA, J.A.M.; PEREIRA, R.M.A.; PEREIRA, M.A.; MOTA, M. (2001). Effect of Lipids and Oleic Acid on Biomass. Development in Anaerobic Fixed-Bed Reactors. Part I: Biofilm Growth and Activity. *Water Research*, v.35, n.1, p.255-263.

AMANN, R. I.; BINDER, B. G.; OLSON, R. J.; CHRISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-target oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, v.56, p.1919–1925.

AMMAN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, v.59, p.143–169.

ANDRADE NETO, C.O.; CAMPOS, J.R. (1999). In: CAMPOS, J.R. (Coord.). *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Rio de Janeiro: ABES: PROSAB.

ANGELIDAKI, I.; AHRING, B.K. (1995). Establishment and Characterization of an Anaerobic Thermophilic (55°C) Enrichment Culture Degrading Long-Chain Fatty Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v.37, p.808-812.

APHA, AWWA, WPCF (1997). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition, American Public Health Association, Washington.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd edition. McGraw-Hill, New York.

BAKKEN, A.P.; HILL, C.G., Jr.; AMUNDSON, C.H. (1990). *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, v.36, p.293-309.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, p.392-416.

BARALDI, E.A. (2001). Avaliação da comunidade e atividade microbianas em reator anaeróbio de leito fixo (RAHLF) operado com pentaclorofenol (PCP) através de métodos cromatográficos, exames microscópicos e técnicas moleculares de PCR, ARDRA e slot-blot. São Carlos. 122p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BECCARI M.; MAJONE, M.; TORRISI L. (1998). Two-reactor system with partial phase separation for anaerobic treatment of olive oil Mill effluents. *Water Science and Technology*, v.38, n.4-5, p.53-60.

BECKER, P.; KOSTER, D.; POPOV, M.N.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN, G.; MARKL, H. (1999). The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under thermophilic conditions. *Water Research*, v.33, n.03, p.653-660.

BLUNDI, C.E. (1988). *Aplicação de métodos alternativos para a determinação de matéria orgânica e biomassa em águas residuárias*. São Carlos. 329p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BOLAÑOS ROJAS, M.L. (2001). *Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas*. São Carlos. 111p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. (1993). Manual de águas residuárias. São Paulo: CETESB

BROUGHTON, M.J.; THIELE, J.H.; BIRCH, E.J., COHEN, A. (1998). Anaerobic batch digestion of sheep tallow. *Water Research*, v. 32, n. 5, p 1423-1428.

CABRAL, A. K.A. (2000). *Avaliação do desempenho e estabilidade de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) submetido ao aumento progressivo na concentração de matéria orgânica afluyente e a cargas de choque orgânicas*. São Carlos. 122p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

CABRAL, A.K.A. (1995). *Caracterização hidrodinâmica de um reator anaeróbio horizontal de leito fixo*. São Carlos. 86p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

CABRAL, J.M.S. (1982). *Estudos de imobilização de enzimas pelo método dos metais de transição – propriedades e modelação de reatores enzimáticos na hidrólise do amido*. Lisboa. Tese (Doutorado) - Inst. Sup. Técnico – Universidade de Lisboa.

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

CONN, E.; STUMPF, P. K. (1984). *Introdução à Bioquímica*. Edgar Blücher, São Paulo.

CONTRERA, R.C. (2003). *Tratamento biológico de líquidos percolados de aterros sanitários utilizando reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 149p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

COULSON, J.M.; RICHARDSON, J.F.; BACKHURST, J.R.; HARKER, J.H. (1991). *Chemical Engineering*. Oxford, v.02. Pergamon Press. p.224-285

CRAVEIRO, A.M. (1994). *Desempenho e estudos cinéticos de biodigestores híbridos com diferentes porcentagens de enchimento*. São Paulo. 246p. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.

CHEN, J. P.; MCGILL, S.D. (1992). *Food Biotechnology*, v.6, p.1-18.

CHEN, J.P.; YANG, B. (1992). *Journal of Food Science*, v.57, p.781-781.

CHERNICHARO, C.A.L.; VAN HANDEL, A.; CAVALCANTI, P.F.F. (1999). In: CAMPOS, J.R. (Coord.). *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Rio de Janeiro: ABES: PROSAB.

CHERNICHARO, C.A.L. (1997). *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. Editora SEGRAG, Belo Horizonte – MG.

CHIBATA, L. (1978). Production of L-amino acids, in Chibata, L. (ed): *Immobilized Enzymes: Research and Development*, p.168 – 178. John Wiley & Sons, New York, London, Sidney, Toronto.

DAMIANOVIC, M.H.R.Z. (1997). *Degradação de pentaclorofenol em reatores anaeróbios horizontais de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 176p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

De NARDI, I.R. (1997). *Influência das características do traçador nas curvas de distribuição de tempos de residência em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 91p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

De NARDI, I.R. (2002). *Degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 171p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

De NARDI, I.R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. (1999). Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors. *Bioprocess Engineering*, v.21, p.469-476.

DEL NERY, V. (1993). *Digestão anaeróbia em duas fases com culturas mistas acidogênicas e metanogênicas imobilizadas separadamente em gel agar*. São Carlos. 320p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O.E. (1961). Volatile acids by direct titration. *Journal of WPCP*, v.33, p.356-365.

DINELLI, D.; MORISI, F. (1974). Fiber entrapped enzymes – In: “*Enzyme Engineering – vol. 2 – Enzyme Technology*”, Editors: Wingard, L.B., Katchalski-Katzir, E. and Goldstein, L., Academic Press, 219p.

Dixon, M.; Webb, E.C. (1979). *Enzymes*, 3rd ed., Longman Group Limited: London.

DOMINGUES, M.R.; ARAÚJO, J.C.; VARESCHE, M.B.; VAZOLLER, R.F. (2002). Evaluation of thermophilic anaerobic microbial consortia using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Water Science and Technology*, v.45, p.22–33.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P.F.F. (1999). In: CAMPOS, J.R. (Coord.). *Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo*. Rio de Janeiro: ABES: PROSAB.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; DEL NERY, V. (1995). Reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de água residuária industrial de papel reciclado. *Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química*, v.12, p.235-239.

GALAVOTI, R.C. (2003). *Efeitos das relações DQO/SO_4^{-2} e das variações progressivas de sulfatos no desempenho de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)*. São Carlos. 265p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

GALBRAITH, A.; BULLARD S. A.; JIAO, K.; NAU, J. J.; MALONE, R. E. 1997. Recombination and the progression of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* v.146; n.481-489.

GALBRAITH, H.; MILLER, T.B.; PATON, A.M.; THOMPSON, J.K. (1971). Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of Applied Bacteriol*, v.34, p.803-813.

GARCIA, H.S.; AMUNDSON, C.H.; HILL JR, C.G. (1991). *Journal of Food Science*, v.56, p.1233-1237.

GARCIA, H.S.; MALCATA, F.X.; HILL, C.G.Jr.; AMUNDSON, C.H. (1992). Use of *Candida Rugosa* lipase immobilized in a spiral wound membrane reactor for the hydrolysis of milkfat. *Enzyme and Microbial Technology*, v.14, p.535-545.

GAVALA, H.N.; KOPSINIS, H.; SKIADAS, I.V.; STAMATELATOU, K. LYBERATOS, G. (1999). Treatment of Dairy Wastewater Using an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. *Journal of Agricultural Engineering Research*, v.73, p.59-63.

GOMIDE, R. (1983). *Propriedades dos Sólidos Particulados*, v.01, cap 08. Ed do autor, São Paulo.

HANAKI, K.; O'NAGASE, M.; MATSUO, T. (1981). Mechanism of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, v.23, n.7, p.1591-1610.

HARPER, S.R.; POHLAND, F.G. (1986). Recent development in hydrogen management during wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. v.28, p.585-602.

HAWKES, F.R.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G.K. (1995). Comparative performance of anaerobic digesters operating on ice-cream wastewater. *Water Research*, v.29, n.2, p.525-533.

HWU, C.S.; DONLON, B.; LETTINGA, G. (1996). Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Water Science Technology*, v.34, n.5-6, p.351-358.

HWU, C.S.; LETTINGA, G. (1997). Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. *Enzyme and Microbial Technology*, v.21, sep, p.297-301.

HWU, C.S.; TSENG, S.K.; YUAN, C.Y.; KULIK, Z.; LETTINGA, G. (1998). Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Research*, v.32, n.5, p.1571-1570.

IVANOV, A.E.; SCHNEIDER, M.P. (1997). Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.3, p.303-309.

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

KASPAGIL, B.; ANDERSON, G.K.; INCE, O. (1994). An investigation into the pretreatment of dairy wastewater prior to aerobic biological treatment. *Water Science Technology*, v.29, n.9, p.205-212.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U.T. (1998). *Biotransformation with lipases*, In: Rehm H. J.; Pihler G.; Stadler A.; Kelly P. J. W. editors. *Biotechnology*, New York, v.8, p.37-192.

KIM, S.H.; HAN, S.K.; SHIN, H.S. (2004). Two-phase treatment system for fat containing wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.79, n.01, p.63-71.

KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, v.22, n.39-48.



LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. (2002). Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.19, n.02, p.175-180.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (2002). *Princípios de Bioquímica*. 3ª ed. Sarvier, São Paulo.

LEHNINGER, A.L. (1990). *Princípios de Bioquímica*, traduzido por W.R. LODI, A.A. SIMÕES. Editora SARVIER, São Paulo.

LIMA, C.A.A. (2001). *Tratamento de esgoto sanitário em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF): escala piloto*. São Carlos. 158p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

LOAIZA CADAVID, D.E.L. (1997). *Avaliação do efeito da relação DQO/sulfato no desempenho do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) tratando substrato sintético*. São Carlos. 102p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

MALCATA, F.X. (1993). Membrane reactors with immobilized lipases: Recent advances. *Trends Chemical Engineering*, v.01, p.359-379.

MALCATA, F.X.; HILL JR, C.G.; AMUNDSON, C.H. (1992). Hydrolysis of buteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor:IV. Effects of temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, v.39, p.1097-1111.

MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probe for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic Applied Microbiology*, v.15, n.593–600.

MASSE, L.; KENNEDY, K.J.; CHOU, S. (2001). Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastesater. *Bioresource Biotechnology*, v.77, p.145-155.

MCCABE, W.L.; SMITH, J.C. (1976). *Unit Operations of Chemical Engineering*. Ed. McGraw-Hill. 3 ed., p.159-168.

METCALF & EDDY, INC (1991). *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse*. 3rd edition, Mc Graw Hill inc., Singapore.

MODOLO, M.R. (2002). Utilização de reatores enzimáticos como unidades de pré-tratamento para sistemas de lodos ativados, utilizando esgoto sintético à base de lipídios. São Carlos. 81p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

MORAES, F.F.; ZANIN, G.M., (1985). Características de fluidização de sílica macroporosa por soluções de amido de mandioca. In: Anais do II Seminário de “Hidrólise Enzimática de Biomassas”. (Editado por G.M. ZANIN e F.F. de MORAES), p.393-411, UEM, Maringá, PR.

MOTTA, L.C. (1985). Utilização de resíduos de industrialização de farinha de mandioca em digestão anaeróbia. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, 119 p.

MOZAFFAR, Z.; WEETE, J. D.; DUE, R. (1994). Influence of surfactants on an extracellular lipase from *pythium ultimum*. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v.71, n.1, p.75-79.

MURRAY, M.; ROONEY, M.V.N.; MONTENEGRO, A.; WEATHERLEY, L.R. (1997). Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. *Process Biochemistry*, n.32, v.6, p.479-486.

NG A, MELVIN W.T; HOBSON, P.N. (1994) Identification of anaerobic digester bacteria using a polymerase chain reaction method. *Bioresource Technology*, v.47, n.73-80.

NIELSEN, T. A.; LIU, W. T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; OMOLIN, S.; STAHL, D. A. (1999). Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* v.65, n.3: p.1251-1258.

NIEMAN, C. (1954). Influence of Trace Amounts of Fatty Acids on the Growth of Microorganisms. *Bacteriological Reviews*, v.18, p.147-163.

OMIL, F.; GARRIDO, J.M.; ARROJO, B. MÉNDEZ, R. (2003). Anaerobic filter reactor performance for the treatment of complex dairy wastewater at industrial scale. *Water Research*, v.37, p.409-410.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VISSER A.; HULSHOFF POL L.W.; STAMS, A.J.M. (1994). Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiol. Rev.* v.15, n.119-136.

PEREIRA, E.B. (1999). *Lipase livre e imobilizada em Quitosana: caracterização e potencial de aplicação em reações de hidrólise e síntese*. Maringá. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá.

PERLE, M.; KIMCHIE, S.; SHELEF, G. (1995). Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Water Research*, v.29, n.6, p.1549-1554.

PETRUY, R.; LETTINGA, G. (1997). Digestion of a milk-fat emulsion. *Bioresource Technology*, v.61, p.141-149.

RASKIN, L.; STROMLEY, J.M.; RITTMAN, B. E.; STAHL, D.A. (1994). Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied Environmental Microbiology*, v.60, p.1232-1240.

RAUNKJAER, K.; HVITVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P.H. (1994). Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Research*, v.28, n.2, p.251-262.

RINCON, N.; CHACIN, E.; MARIN, J.; TORRIJOS, M.; MOLETTA, R.; FERNANDEZ, N. (2003). Anaerobic biodegradability of water separated from estrated crude oil. *Environmetal Technology*, v.24, n.8, p.963-970.

RINZEMA, A.; BOONE, M.; VAN KNIPPENBERG, K.; LETTINGA, G. (1994). Bactericidal effect of long chain fatty acids in anaerobic digestion, *Water Environment Research*, v.66, n.1, p.40-49.

RINZEMA, A.; Van VEEN, H.; LETTINGA, G. (1993). Anaerobic digestion of triglyceride emulsions in expanded granular sludge bed reactors with modified sludge separators. *Environmental Technology*, v.14, p.423-432.

RIPLEY, L.E.; BOYLE, W.C.; CONVERSE, J.C. (1986). Improved alalinimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *Journal Water Pollution Control Federation*, v.58, p.406-411.

ROCHA, J.M.S. (2000). Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia*, v.5, p.25.

ROY, F.; ALBAGNAC, G.; SAMAIN, E. (1985). Influence of calcium addition on growth of highly purified syntrophics cultures degrading long-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, p.702-705.

SAATCI Y.; ARSLAN E.I.; KONAR V. (2003). Removal of lipids and fatty acids from sunflower oil factory effluent by UASB reactor. *Bioresource Technology*, v.87, n.3, p.269-272.

SALMINEN, E.; RINTALA, J. (2002). Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste - A review. *Bioresource Technology*, v.83, p.13-26.

SALMINEN, E.; RINTALA, J.; HÄRKÖNEN, J.; KUITUNEN, M.; HÖGMANDER; H. OIKARI, A. (2001). Anaerobically digested poultry slaughterhouse wastes as fertilizer in agriculture. *Bioresource Technology*, v.78, p.81-88.

SALMINEN, E.; RINTALA, J.; LOKSHINA, L.Ya.; VAVILIN, V.A. (2000). Anaerobic batch degradation of solid poultry slaughterhouse waste. *Water Science and Technology*, v.41, n.3, p.33-41.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. (1958). Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.30, n.3, p.513-521.

SARTI, A. (1998). *Avaliação de desempenho do reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) no tratamento de substrato sintético simulando esgoto doméstico*. São Carlos. 105p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SEDMAK, J.J.; GROSSBERG.E. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, v.79, p.544-553.

SILVA, D.J. (1998). *Produção de maltodextrina com baixo teor de glicose*. Maringá. 77p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá.

SPEECE, R.E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Nashville: Archae Press.

VAN HAANDEL, A.C.; LETTINGA, G. (1994). *Anaerobic sewage treatment – A practical guide for regions with a hot climate*. Chichester, England. John Wiley & Sons Ltd.

VARESCHE, M.B.; ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; VAZOLLER, R.F.; FORESTI, E. (1997). Microbial colonization of polyurethane foam matrices in horizontal flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor. *Applied Microbiology Biotechnology* v.48, n.4, p.534-538.

VELA, F.J. (1999). Influência da relação DQO/SO e da velocidade superficial do líquido sobre a velocidade de degradação da matéria orgânica em reatores anaeróbios de leito fixo. São Carlos. 128p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

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

ZAIAT, M. (1996). *Desenvolvimento de reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) para tratamento de águas residuárias*. São Carlos. 157p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ZAIAT, M.; CABRAL, A.K.A.; FORESTI, E. (1994). Reator anaeróbio horizontal de leito fixo para tratamento de águas residuárias: concepção e avaliação preliminar de desempenho. *Revista Brasileira de Engenharia – Caderno de Engenharia Química*, v.11, n.109-121.

ZAIAT, M.; VIEIRA, L.G.T.; FORESTI, E. (1997). Spatial and temporal variations of monitoring performance parameters in horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor treating synthetic substrate, *Water Research*, v.31, n.7, p.1760-1766.

ZANIN, G.M. (1989). *Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada*. Campinas. 499p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.