

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de São Carlos

**BIODIGESTÃO ANAERÓBIA MESOFÍLICA DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE
LATICÍNIO EM SISTEMA CONJUGADO DE REATOR HIDROLÍTICO
SEGUIDO DE REATOR METANOGENICO**

ALEX MARQUITI ALVES

Orientadora: Prof^{ta}. Dr^a. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP/SP
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS - EESC
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO**

ALEX MARQUITI ALVES

**BIODIGESTÃO ANAERÓBIA MESOFÍLICA DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE
LATICÍNIO EM SISTEMA CONJUGADO DE REATOR HIDROLÍTICO
SEGUIDO DE REATOR METANOGÊNICO**

SÃO CARLOS-SP

2023

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP/SP
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS - EESC
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO**

ALEX MARQUITI ALVES

**BIODIGESTÃO ANAERÓBIA MESOFÍLICA DA ÁGUA RESIDUÁRIA DE
LATICÍNIO EM SISTEMA CONJUGADO DE REATOR HIDROLÍTICO
SEGUIDO DE REATOR METANOGENICO**

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic.

**VERSÃO CORRIGIDA
SÃO CARLOS-SP**

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

A474b Alves, Alex Marquiti
 Biodigestão anaeróbia mesofílica da água
 residuária de laticínio em sistema conjugado de reator
 hidrolítico seguido de reator metanogênico / Alex
 Marquiti Alves; orientadora Márcia Helena Rissato
 Zamariolli Damianovic. São Carlos, 2023.

 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
 Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
 Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
 Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
 2023.

 1. Biodigestão anaeróbia. 2. Células íntegras.
 3. Hidrólise enzimática. 4. *Penicillium citrinum*. I.
 Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **ALEX MARQUITI ALVES**.

Título da tese: "Biodigestão anaeróbia mesofílica da água residuária de laticínio em sistema conjugado de reator hidrolítico seguido de reator metanogênico".

Data da defesa: 02/06/2023.

Comissão Julgadora

Resultado

Profa. Dra. **Marcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**
(Orientadora)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

Profa. Dra. **Grazielle Santos Silva Andrade**
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

Aprovado

Prof. Dr. **Rafael Brito de Moura**
(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

Aprovado

Profa. Dra. **Deize Dias Lopes**
(Universidade Estadual de Londrina/UEL)

Aprovado

Prof. Dr. **André Luiz Meleiro Porto**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC-USP)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Associado **Juliano Jose Corbi**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Carlos De Marqui Junior**

À Danieli, minha amada esposa.

Aos meus pais, Elidiane e Robinson, a base de tudo.

À minha querida avó Arminda (*in memorian*) e avô José (*in memorian*), quanta saudade.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por estar sempre comigo, seja em momentos bons ou ruins, me fortalecendo para “vencer na vida” e conquistar todos os meus sonhos e objetivos.

À Nossa Senhora Aparecida, mãezinha do céu.

A minha esposa, Danieli, pelos seus ótimos conselhos em momentos de desespero. Por acreditar nas minhas “loucuras” e vivenciar elas comigo. Pelo companheirismo, carinho e respeito mútuo. Seu amor me fortalece.

Aos meus pais, Elidiane e Robinson, por acreditarem sempre em meu potencial, apoio incondicional, proteção, amizade, carinho e confiança. Aos meus irmãos e irmãs, Robinson Jr., Renan, Rener, Ana Laura e Maria Elisa, vocês são ímpares.

Ao meu padrasto, Fábio, pelo incentivo e apoio.

A minha tia, Vânia. Obrigado pela hospitalidade, companheirismo e amizade.

Aos meus avôs maternos, Arminda (*in memorian*) e José (*in memorian*), sempre serei grato a vocês e quanta falta vocês me fazem. Aos meus avôs paternos, Zulmira e Arlindo, eu os amo.

Aos demais familiares que de alguma forma contribuíram para o encerramento desta etapa. Família Marquiti, Alves, Machado e Vianna, meu muito obrigado.

À professora, Dr^a. Márcia Damianovic, minha amiga e orientadora, gratidão pelo acolhimento e conselhos prestados ao longo dessa jornada, sem você nada disso seria possível. Me inspiro em você.

Ao corpo docente do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da EESC/USP, em especial ao Marcelo Zaiat, Eugênio Foresti, Maria Bernadete, Wiclef Marra e Márcia Damianovic. A troca de conhecimento foi fundamental, seja no “cafezinho” ou em sala de aula.

Aos amigos e colegas do LPB, obrigado pelas conversas descontraídas e sabiamente pontuadas. Que grupo sensacional e eficiente. Levarei a amizade de todos vocês sempre comigo.

Ao grupo de estudo dos orientados da professora Márcia, as reuniões me mostraram que estava no caminho certo, eterna gratidão.

Às técnicas do LPB, em especial à Carol Sabatini (sala de análises), Maria Janja (sala de cromatografia), Isabel Sakamoto e Eloisa Pozzi (sala de microbiologia). Obrigado pelo suporte e gerenciamento das atividades realizadas no LPB. Vocês são

feras e indispensáveis.

À Silvana (técnica administrativa) e ao Fernando (técnico de informática), exemplo de profissionais.

Ao professor Dr. André Luiz Meleiro Porto, do Instituto de Química da USP, *campus* de São Carlos/SP, por, prontamente, ceder seu laboratório para a realização de análises e compartilhamento de seus conhecimentos. Aos seus orientados, em especial ao Samuel, meu muito obrigado.

Ao professor Dr. Roberto Berlinck, do Instituto de Química da USP, *campus* de São Carlos/SP, por providenciar a cepa do fungo *P. citrinum*, para a realização das atividades deste trabalho.

Aos demais colaboradores, em todos os níveis da instituição e à Escola de Engenharia da Universidade de São Paulo (EESC/USP). Obrigado por proporcionar todas as condições necessárias para minha titulação como Doutor em Ciências.

Ao professor Dr. Leonardo Henrique Soares Damasceno, da Universidade Federal de Alfenas, *campus* de Engenharia de Poços de Caldas/MG. Obrigado pelos ensinamentos referentes aos ensaios hidrodinâmicos.

Aos professores e amigos, Rafael Brito de Moura e Grazielle Santos Silva Andrade, pelas estimadas contribuições na qualificação deste trabalho, seus conselhos e orientações me ajudaram a ser um profissional melhor.

À Universidade Federal de Alfenas, *campus* Poços de Caldas/MG, pela graduação e mestrado, essenciais para ingresso no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento da EESC/USP.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa.

Ao Eng. Moacir e ao Laticínio Hopelat pela disponibilidade em ceder efluente para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 168731/2018-5, pelo fornecimento de bolsa e auxílio financeiro (taxa de bancada), fundamental para as atividades realizadas.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), indispensável ao LPB, por meio de seu projeto temático (2015/06246-7), provendo de condições necessárias para a realização e manutenção de suas atividades.

A todos que me auxiliaram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, cujo nome não foi citado por me faltarem à memória.

Meus sinceros agradecimentos!

“Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.”
Paulo Freire

“Eu tentei 99 vezes e falhei,
na centésima tentativa eu consegui,
nunca desista de seus objetivos,
mesmo que esses pareçam impossíveis,
a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”
Albert Einstein

RESUMO

ALVES, A.M. **Biodigestão anaeróbia mesofílica da água residuária de laticínio em sistema conjugado de reator hidrolítico seguido de reator metanogênico.** 2023. 234 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

Os efeitos da aplicação do pré-tratamento biológico da água residuária (AR) de laticínio com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*, em reatores contínuos de fase ácida, foram investigados objetivando-se a redução do tempo de tratamento anaeróbio convencional, melhora da qualidade efluente e aumento da produção de biogás, em reator contínuo de leito fixo (AnSTBR). Os reatores hidrolíticos (RH) inoculados com diferentes concentrações de células íntegras, associados a diferentes concentrações enzimáticas (7500 e 22500 U), foram operados à temperatura de 37°C e TDH de 12 horas. Os efluentes do processo hidrolítico serviram de substrato para o reator metanogênico. Durante a fase ácida de operação (pré-tratamento), foram alcançadas remoções de DQO inferiores a 20% e bioconversões médias superiores a 90% para glicéris e carboidratos totais, enquanto que valores médios inferiores a 40% foram obtidos para proteínas totais. Além da presença do fungo *Penicillium citrinum* como microrganismo inicialmente inoculado nos RHs e por meio da caracterização metagenômica, dada pela amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16S, pode-se atribuir a predominância de *Streptococcus*, microrganismo de maior abundância relativa encontrado na AR bruta, à fase de conversão inicial de lactose em ácido láctico, enquanto que a predominância de *Clostridium* esteve relacionada à fase de produção de ácidos graxos, com maiores abundâncias relativas nos RHs. Na avaliação dos efeitos do pré-tratamento biológico para remoção de DQO e produção de biogás no reator AnSTBR, inoculado com lodo anaeróbio, operado sob temperatura de 37°C, carga orgânica volumétrica (COV) de 6,0-7,0 kgDQO/(m³.dia) e 0,3 gNaHCO₃/gDQO, os resultados mostraram redução do tempo total requerido de tratamento de 42 horas (única etapa) para 32 horas, quando o reator hidrolítico (TDH de 12 horas) precedeu o reator metanogênico (TDH de 20 horas). Foi observada a produção estável do biogás, com concentração de metano próximo a 75%, em todas as fases de operação do reator AnSTBR alimentado com AR pré-tratada. O pré-tratamento biológico da AR de laticínio, em RH com 7500 U, mostrou aumento no rendimento de metano calculado de 290 para 338-355 mL CH₄/gDQO removida, produção volumétrica de metano de 4900 para 11200-11950 mL e produção volumétrica diária de metano de 1500 para 1810 mL CH₄/(L.dia). A alimentação do reator AnSTBR com AR pré-tratada induziu ao aumento da produção de metano pela via hidrogenotrófica, além de provocar mudanças significativas na diversidade bacteriana encontrada, com destaque para *Lentimicrobium*, com abundância relativa de 16,55%, seguido de *Blvii28 wastewater-sludge* (10,75%) e *Pelotomaculum* (10,46%). Para o domínio *fungi*, ao final da operação do reator AnSTBR com AR pré-tratada, foi identificada a predominância de *Penicillium*, anteriormente não encontrado pelo sequenciamento do gene ITS1 e ITS2. Tais efeitos evidenciam o potencial do pré-tratamento da AR com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*, associando-a aos benefícios biodigestão anaeróbia, como unidade principal do tratamento de efluentes.

Palavras-chave: Biodigestão anaeróbia. Células íntegras. Hidrólise enzimática. *Penicillium citrinum*.

ABSTRACT

ALVES, A.M. **Mesophilic anaerobic digestion of dairy wastewater in a coupled system by hydrolytic reactor and methanogenic reactor.** 2023. 234p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

The effects of the application of the biological pre-treatment of DWW with whole cells by filamentous fungus *Penicillium citrinum*, in continuous acid phase reactors, were investigated with the aim of reducing the time of conventional anaerobic treatment, improving the effluent quality and increasing biogas production in an Anaerobic Structured Bed Reactor (AnSTBR). The hydrolytic reactors (HRs) inoculated with whole cells, associated with different enzyme concentrations (7500 and 22500 U), were operated at a temperature of 37°C and HRT of 12 hours. The effluents from the hydrolytic process were used as substrate for the methanogenic reactor in a later stage. During the pre-treatment, COD removals below 20% and average bioconversions above 90% were achieved for glycerols and total carbohydrates, while average values below 40% were obtained for total proteins. In addition to the presence of the fungus *Penicillium citrinum* as the microorganism initially inoculated in the HRs and through the metagenomic characterization, given by the amplification and sequencing of the 16S rRNA gene, the predominance of the *Streptococcus*, the microorganism with the highest relative abundance found in the CDWW, can be attributed to the initial conversion of lactose into lactic acid, while the predominance of *Clostridium* was related to the phase of volatile fatty acid (VFA) production, with higher relative abundances in RHs. In the evaluation of the effects of biological pre-treatment for COD removal and biogas production in the AnSTBR reactor, inoculated with anaerobic sludge, operated at 37°C, OLR of 6.0-7.0 kgCOD/(m³.day) and 0.3 gNaHCO₃/gCOD, the results showed reduction in the total treatment time required from 42 hours (single stage) to 32 hours, when the hydrolytic reactor (HRT of 12 hours) preceded the methanogenic reactor (20 hours). A stable production of biogas was observed, with methane concentration close to 75%, in all operating phases of the AnSTBR reactor fed with pre-treated DWW. The biological pre-treatment of DWW, in HR with 7500 U, showed the improvement of the calculated methane yield from 290 to 338-355 mL CH₄/gCOD removed, methane volumetric production from 4900 to 11200-11950 mL and daily volumetric production of methane from 1500 to 1810 mL CH₄/(L.day). Feeding the AnSTBR reactor with pre-treated DWW induced an increase in methane production by the hydrogenotrophic pathway, in addition to causing colorful changes in the bacterial diversity found, with emphasis on *Lentimicrobium*, with a relative abundance of 16.55%, followed by *Blvii28 wastewater- sludge* (10.75%) and *Pelotomaculum* (10.46%). For the fungi domain, at the end of the operation of the AnSTBR reactor with pre-treated DWW, the predominance of the *Penicillium*, previously not found, was identified by sequencing the ITS1 and ITS2 gene. Such effects demonstrate the potential of DWW pre-treatment with whole cells by filamentous fungus *Penicillium citrinum*, associating it with the benefits of anaerobic digestion, as the main unit of effluent treatment.

Keywords: Anaerobic digestion. Whole cells. Enzymatic hydrolysis. *Penicillium citrinum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais produtos lácteos em relação ao número de laticínios existentes..	40
Figura 2 - Esquema simplificado das etapas da digestão anaeróbia.....	47
Figura 3 - Hidrólise de triglicerídeos.	63
Figura 4 - Principais reações catalisadas pelas lipases.	65
Figura 5 - Fluxograma referente ao procedimento de execução do projeto de pesquisa.	79
Figura 6 - <i>P. citrinum</i> em (a) tubo de ensaio com tampa roscável e em (b) placa de petri. Ambos crescidos em meio sólido PDA.	80
Figura 7 - Meio de cultura líquido sintético (esquerda) e meio de cultura líquido sintético com espumas PU (direita).	81
Figura 8 - (a) Frasco reator para hidrólise enzimática da água residuária da indústria de laticínio utilizando células íntegras lipolíticas do fungo filamentoso <i>P. citrinum</i> e (b) frasco reator com água residuária e lodo anaeróbio para avaliação da digestão anaeróbia.	83
Figura 9 - Configuração mecânica do reator contínuo (a) hidrolítico com fungos livres (pellets), (b) hidrolítico de leite estruturado (biomassa fúngica imobilizada) e (c) metanogênico de leite estruturado (biomassa anaeróbia imobilizada).	83
Figura 10 - Leite estruturado dos reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos.	84
Figura 11 - Sistema de quantificação do biogás gerado durante a biodegradação anaeróbia da AR da indústria de laticínio em reator contínuo.	85
Figura 12 - (a) Cultivo de células íntegras imobilizadas com meio de cultura contaminado por bactérias; (b) cultivo de células íntegras livres sem contaminação; (c) filtração a vácuo das células íntegras cultivadas e (d) células íntegras livres (biomassa fúngica).	86
Figura 13 - Aparatado experimental para a realização da hidrólise básica da AR de laticínio como padrão para o monitoramento da hidrólise enzimática em reatores contínuos.	89
Figura 14 - Ensaio hidrodinâmico do reator RH1.CBL.	94
Figura 15 - Cromatograma obtido por GC-FID da amostra contendo (a) 50 mg de óleo de soja Liza [®] por mL de solvente Acetato de Etila e (b) * óleo de soja comercial Liza [®] - concentração não especificada.	99
Figura 16 - Gráficos obtidos das análises do óleo de soja Liza sob diferentes concentrações para fornecer a equação da reta, o ajuste e a tendência de resposta. (a) Pico de analito em 20,2 minutos. (b) Pico de analito em 21,06 minutos.	101
Figura 17 - Cromatograma obtido a partir da análise por GC-FID de 30 mg de azeite de oliva/mL de solvente Acetato de Etila.	101
Figura 18 - (a) Extração e separação de fases, em funil de separação, pela adição do solvente extrator na amostra contendo lipídeos; (b) evaporação do solvente extrator, na fase de interesse, em rotaevaporador e (c) obtenção do concentrado para análise cromatográfica.	103
Figura 19 - Cromatogramas resultantes das extrações de lipídeos de AR de laticínios com: (a) Acetato de Etila, (b) Acetonitrila, (c) Clorofórmio, (d) n-Hexano e (e) mistura de Clorofórmio/Metanol (2:1). Concentração das amostras injetadas de 30 mg/mL de solvente Acetato de Etila.	104
Figura 20 - Cromatogramas obtidos por GC-FID das amostras contendo lipídeos da AR de laticínio: (a) extraídos com Acetonitrila; (b) extraídos com Acetonitrila e metilada; (c) extraídos com n-Hexano e (d) extraídos com n-Hexano e metilada.	106

Figura 21 – Amostras de AR de laticínio: (a) AR bruta; (b) Reação de hidrólise da AR bruta após a catálise básica com NaOH; (c) Separação de fases da amostra; (d) Neutralização da reação de hidrólise com HCl para posterior extração por partição líquido-líquido, concentração e análise cromatográfica.	107
Figura 22 - Cromatogramas obtidos via GC-FID do (a) tratamento químico (hidrólise básica) da AR bruta de laticínio e (b) AR bruta de laticínio – controle. Concentração das amostras injetadas de 30 mg/mL de solvente Acetato de Etila.....	108
Figura 23 - (a) Meio de cultura líquido para o cultivo de células íntegras livres; (b) células íntegras livres em meio de cultura; (c) meio de cultura líquido para o cultivo de células imobilizadas em espumas PU; (d) células íntegras imobilizadas.	109
Figura 24 – (a) Micrografia óptica de luz comum das células íntegras livres e (b) aproximação com contraste de fase (aumento de 1250X).....	110
Figura 25 – Constante de desativação e tempo de meia vida enzimática para concentração de lipídeo no meio reacional de (a) 5,2% m/v e (b) 3% m/v.	112
Figura 26 - Constante de desativação e tempo de meia vida enzimática utilizando a própria AR de laticínio como substrato.	113
Figura 27 – Frascos batelada da (a) condição 1 - AR da indústria de laticínio e lodo anaeróbico e (b) condição 4 - AR da indústria de laticínio e biomassa fúngica.....	114
Figura 28 - Perfil da produção de (a) metano e (b) gás carbônico acumulado.....	116
Figura 29 - Perfil de degradação da MO, avaliada em termos de DQO, da AR de laticínio Hopelat, durante os ensaios preliminares do processo hidrolítico e metanogênico.....	119
Figura 30 – Perfil de glicerol, proteína, carboidratos totais e teor de acidez para os ensaios contendo (a) AR e lodo anaeróbico e (b) AR e células íntegras livres do fungo filamentososo <i>P. citrinum</i>	121
Figura 31 - Perfil de glicerol, proteína, carboidratos totais e teor de acidez para os ensaios contendo (a) AR, lodo anaeróbico e células íntegras livres do fungo filamentososo <i>P. citrinum</i> e (b) AR, lodo anaeróbico e células íntegras imobilizadas do fungo filamentososo <i>P. citrinum</i>	121
Figura 32 - (a) Camada de espuma presente no meio reacional contendo efluente de laticínio e lodo anaeróbico; (b) não evidência de camada de espuma presente nos ensaios contendo células íntegras de fungos filamentosos.....	123
Figura 33 – (a) AR e biomassa fúngica e (b) preparo do sistema para obtenção de um sistema anaeróbico.	124
Figura 34 - Remoção de DQO solúvel da AR diluída de laticínio.	125
Figura 35 - Perfis de conversão de carboidratos solúveis da AR diluída.	126
Figura 36 - Perfis de conversão de proteínas solúveis da AR diluída.	127
Figura 37 - Perfis de formação e consumo de glicerol solúvel da AR diluída.	128
Figura 38 – Perfil de (a) acidez total e (b) pH do meio racional em função do tempo de operação dos ensaios.	129
Figura 39 – (a) Operação de reator contínuo hidrolítico/fermentativo de leite estruturado contendo (b) destaque das células íntegras imobilizadas em tiras de espuma de poliuretano.	131
Figura 40 – Cromatogramas obtidos via GC-FID evidenciando os picos das frações de lipídeos e seus respectivos tempos de retenção das amostras do reator (a) RHA1 – afluente; (b) RHA1 – efluente; (c) RH3 – afluente; (d) RH3 – efluente; (e) RH4 – afluente e (f) RH4 – efluente. Solvente extrator Clorofórmio/Metanol (2:1). Concentração de 30 mg amostra/mL de solvente Acetato de Etila.	133
Figura 41 – Cromatogramas obtidos via GC-FID evidenciando os picos das frações de lipídeos e seus respectivos tempos de retenção das amostras do reator RH4 no (a)	

afluente; (b) em metade do volume útil de trabalho do reator e (c) no efluente pré-tratado. Solvente extrator Clorofórmio/Metanol (2:1). Concentração de 30 mg amostra/mL de solvente Acetato de Etila.	134
Figura 42 – Perfis de acidez total (%) durante a operação do reator (a) RHA1; (b) RHA2; (c) RH3 e (d) RH4.....	136
Figura 43 – Perfil do reator RH5 mediante o emprego de células íntegras do fungo filamentososo <i>P. citrinum</i>	138
Figura 44 – Perfil de (a) carboidratos, (b) proteínas e (c) glicerol do reator RH5.	139
Figura 45 – Cromatogramas obtidos via GC-FID evidenciando os picos das frações de lipídeos e seus respectivos tempos de retenção das amostras do reator (a) RH5 – afluente; (b) RH5 – efluente. Solvente extrator Clorofórmio/Metanol (2:1). Concentração de 30 mg amostra/mL de solvente Acetato de Etila.	140
Figura 46 – (a) Teor de acidez e (b) pH do reator RH5.....	141
Figura 47 – Monitoramento do reator metanogênico AnSTBR1 e suas respectivas etapas de operação quanto à remoção de DQO da água residuária bruta de laticínio. .	144
Figura 48 – Remoção de DQO da água residuária bruta de laticínios em função do aumento da COV afluente aplicada para 0,7 gNaHCO ₃ /gDQO.....	145
Figura 49 – Reativação do reator AnSTBR1 para remoção de DQO da água residuária de laticínios em função do aumento da COV afluente aplicada para 0,7 gNaHCO ₃ /gDQO.	146
Figura 50 – Remoção de DQO em função da redução de alcalinizante para a COV aplicada de 5,0 – 7,0 kgDQO/m ³ .dia.	147
Figura 51 – Remoção de DQO da AR de laticínio para a COV aplicada de 5,0 – 7,0 kgDQO/m ³ .dia e 0,5 gNaHCO ₃ /gDQO afluente.	149
Figura 52 – Monitoramento do reator AnSTBR1 e suas respectivas etapas de operação quanto à degradação de (a) carboidratos, (b) proteínas e (c) glicerol da AR bruta de laticínio.	150
Figura 53 – Perfil da eficiência de remoção das proteínas presentes na AR bruta de laticínio durante a operação do reator metanogênico AnSTBR1.	152
Figura 54 – Monitoramento do pH do reator metanogênico e suas respectivas etapas de operação.....	152
Figura 55 – Monitoramento da alcalinidade do reator metanogênico AnSTBR1 operado com AR bruta de laticínio.....	154
Figura 56 – Monitoramento do reator metanogênico AnSTBR2 e suas respectivas etapas de operação quanto à remoção de DQO da AR de laticínio pré-tratada. Carga orgânica volumétrica afluente de 5 kgDQO/m ³ .dia e 0,3 gNaHCO ₃ /gDQO.....	156
Figura 57 – Monitoramento do reator metanogênico AnSTBR2 e suas respectivas etapas de operação quanto à degradação de (a) carboidratos, (b) proteínas e (c) gliceróis da AR de laticínio pré-tratada.	159
Figura 58 – Monitoramento do pH do reator metanogênico AnSTBR2 com afluente pré-tratado e suas respectivas etapas de operação.	160
Figura 59 – Monitoramento da alcalinidade do reator metanogênico AnSTBR2 operado com AR pré-tratada.....	161
Figura 60 – Taxa de produção de biogás, porcentagem de CH ₄ e CO ₂ durante a operação do reator metanogênico (a) AnSTBR1, alimentado com AR bruta e TDH de 42 horas, e (b) AnSTBR2, alimentado com AR pré-tratada e TDH 20 horas.	162
Figura 61 – Operação do reator metanogênico AnSTBR, com AR bruta e pré-tratada, especificando o metano em função do (a) rendimento calculado – YM; (b) produção volumétrica – mL de CH ₄ ; (c) produção volumétrica diária – PVDM e (d) taxa molar – TMM.....	165

Figura 62 – Imagens digitais das corridas em EGA das amostras 1, 2, 3, 4/5 e 6/7....	167
Figura 63 – Filos do domínio Bacteria/Archaea identificados nas amostras ambientais de (a) AR bruta– amostra 1, (b) controle autoinoculados (RHA1 e RHA2) – amostra 2 e (c) reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentososo <i>P. citrinum</i> (RH3, RH4 e RH5) – amostra 3.	169
Figura 64 – Micrografia óptica com contraste de fase e aumento de 1250x da AR bruta do laticínio Hopelat, evidenciando a presença de bactérias similares ao <i>Streptococcus</i>	171
Figura 65 – Filos do domínio Bacteria e Archaea (sublinhado) identificados nas amostras ambientais dos reatores metanogênicos (a) AnSTBR1 alimentado com AR bruta de laticínio – mostra 4 e (b) AnSTBR2 alimentado com AR pré-tratada – amostra 6.	176
Figura 66 – Representação da distribuição dos gêneros do domínio fungi sequenciados das amostras ambientais do reator metanogênico (a) AnSTBR1 e (b) AnSTBR2.	183
Figura 67 – Curva resposta tipo F do reator hidrolítico/fermentativo (a) RH1 com biomassa livre – RH1.CBL; (b) RH1 com leito estruturado - RH1.CLE; (c) RH2 com biomassa livre - RH2.CBL e (d) RH2 com leito estruturado – RH2.CLE.	186
Figura 68 – Curva resposta tipo F dos reatores metanogênicos operados com AR de laticínio (a) bruta – AnSTBR1 e (b) com AR pré-tratada – AnSTBR2.	188

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ranking das 10 maiores empresas de laticínios do Brasil - 2017.....	40
Tabela 2 - Ranking das 10 maiores empresas de laticínios do Brasil – 2017 (continuação).	41
Tabela 3 - Composição média da água residuária gerada no processamento do leite, da manteiga, do soro de leite e da fabricação de sorvete.	44
Tabela 4 - Características físico-químicas do efluente da indústria de produtos lácteos.	45
Tabela 5 - Concentração de lipídeos em águas residuárias e suas principais fontes de geração.	46
Tabela 6 - Estudos de caso envolvendo o tratamento de águas residuárias da indústria de produtos lácteos.	56
Tabela 7 - Solventes avaliados na etapa de extração líquido-líquido de lipídeos.	87
Tabela 8 - Parâmetros e condições operacionais da etapa de avaliação dos perfis metabólicos na biodegradabilidade da água residuária de laticínio utilizando células íntegras livres do fungo filamentososo <i>P. citrinum</i>	93
Tabela 9 - Especificação dos reatores contínuos e seus respectivos valores de tempo de detenção hidráulicos teóricos.....	93
Tabela 10 – Parâmetros e equações do modelo de caracterização hidrodinâmica de Levenspiel (1999).	95
Tabela 11 - Parâmetros das amostras ambientais microbianas para sequenciamento....	96
Tabela 12 - Métodos analíticos.	97
Tabela 13 - Valores de atividade enzimática e teores de umidade para os cultivos celulares do fungo filamentososo <i>P. citrinum</i>	112
Tabela 14 - Características físico-químicas da AR da indústria de Laticínio Hopelat.	115
Tabela 15 - Eficiência média de remoção de DQO e variância dos reatores hidrolíticos/fermentativos.	132
Tabela 16 - Teor de acidez total (%) afluente e efluente para as condições testadas na operação dos reatores hidrolíticos/fermentativos.	137
Tabela 17 – Desempenho médio de operação dos reatores hidrolíticos/fermentativos.	142
Tabela 18 - Efeitos da redução de alcalinizante sobre a eficiência de remoção de DQO da AR bruta de laticínio.	148
Tabela 19 – Síntese das condições afluentes do reator metanogênico AnSTBR2.	156
Tabela 20 – Eficiência de remoção de DQO, concentração afluente e efluente do reator metanogênico AnSTBR2, operado com AR pré-tratada dos reatores hidrolíticos/fermentativos, sob suplementação de 0,3 gNaHCO ₃ /gDQO.....	157
Tabela 21 - Quantidade de DNA em função do tamanho de fragmento para diferentes volumes de amostra aplicada.	167
Tabela 22 – Concentração e pureza das soluções de DNA extraído.	168
Tabela 23 - Ácidos orgânicos formados nas fases operacionais dos reatores hidrolíticos/fermentativos e na AR bruta de laticínio.	170
Tabela 24 - Caracterização taxonômica em relação ao filo, ordem e gênero das amostras microbiológicas referentes aos reatores metanogênicos operados AnSTBR1 e AnSTBR2.	181

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% = porcentagem

$\bar{\theta}_h$ = TDH médio calculado

σ^2 = variância da curva

σ_{admin}^2 = variância da curva adimensional

$[E_0]$ = concentração enzimática ativa inicial

$[E]$ = concentração de enzima ativa

°C = graus Celsius

a.a = ao ano

AbRel = abundância relativa

Aflu = afluyente

AGCL = ácidos graxos de cadeia longa

AI = alcalinidade intermediária

ALA = alfa-lactoalbumina

AnSTBR = reator anaeróbico de leito estruturado

AP = alcalinidade parcial

APHA = *American Public Health Association*

AR = água residuária

atm = atmosfera

ATP = adenosina trifosfato

B.F = biomassa fúngica livre

B.F.I = biomassa fúngica imobilizada

BD = biodiesel

BF = biomassa fúngica

BFI = biomassa fúngica imobilizada

BHT = hidroxitolueno butilado

BLG = beta-lactoglobulina

BSA = albumina do soro bovino

CCGL = Cooperativa Central Gaúcha Ltda

CCPR = Cooperativa Central dos Produtores Rurais de Minas Gerais

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ = molécula de ácido graxo genérica

$\text{CH}_4\%$ = porcentagem de metano

cm = centímetro

CNPq = Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNTP = Condições Normais de Temperatura e Pressão

$\text{CO}_2\%$ = porcentagem de dióxido de carbono

COV = carga orgânica volumétrica

COVID = doença do corona vírus

CPQBA = Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

CSTR = reator de tanque com agitação contínua (tanque agitado)

D = coeficiente de dispersão longitudinal

d = dia

DA = digestão anaeróbia

DAG = diglicerídeo

DBO = demanda bioquímica de oxigênio

DBO_5 = demanda bioquímica de oxigênio cinco

DBO_u = demanda bioquímica de oxigênio última

DNA = ácido desoxirribonucleico

DQO = demanda química de oxigênio

DQO_i = demanda química de oxigênio inicial

DTR = distribuição do tempo de residência

DTR_{adim} = distribuição do tempo de residência adimensional

EC = *Enzyme Commission*

EESC = Escola de Engenharia de São Carlos

Eflu = efluente

EGA = eletroforese em gel de agarose

EGSB = reator anaeróbio de leito granular expandido

EPS = substâncias poliméricas extracelulares

EUV = espectrometria de absorção no ultravioleta

FA = filtro anaeróbio

FADH = flavina adenina dinucleotídeo

FAPESP = Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo

FID = detector de ionização de chama

g = grama

GC = *gas chromatography* (cromatografia gasosa)

GMP = glico-macropéptido

h = hora

HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência

IAL = Instituto Adolfo Lutz

ICPA = *International Commission on Penicillium and Aspergillus*

Ig = imunoglobulina

IQSC = Instituto de Química de São Carlos

ITS = *Internal Transcribed Spacer*

k_d = constante de desativação enzimática

kDa = kilodalton

kg = quilograma

kHz = quilohertz

L = litro

L-L = líquido – líquido

LPB = Laboratório de Processos Biológicos

m = massa

M = mol/L

m^3 = metro cúbico

MAG = monoglicerídeo

MBBR = reator biológico de leito móvel

MBR = reator de membrana

mg = miligrama

min = minuto

mL = mililitro

mmol = milimole

MO = matéria orgânica

N = número de reatores em série
N = número de tanques em série
N° = número
NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo
NT = nitrogênio total
O&G = óleos e graxas
OD = oxigênio dissolvido
pb = par de base
PBR = reator tubular de leito de recheio inerte (leito fixo)
PCR = *Polymerase Chain Reaction*
PDA = batata dextrose ágar
pH = potencial hidrogeniônico
pHi = potencial hidrogeniônico inicial
PI = padrão interno
PT = fósforo total
PU = poliuretano
PVDM = produção volumétrica diária de metano
RAC = reator anaeróbio compartimentado
RAFA = reator anaeróbio de manta de lodo
RBS = reator em batelada sequencial
RDNA = redução dissimilatória de nitrato para amônio
RH = reator hidrolítico/fermentativo
RH.CBL = reator hidrolítico com biomassa livre
RH.CLE = reator hidrolítico com leito estruturado
RM = reator metanogênico
RNA = ácido ribonucleico
rpm = rotação por minuto
rRNA = RNA ribossomal
SS = sólidos suspensos
SST = sólidos suspensos totais

SSV = sólidos suspensos voláteis
ST = sólidos totais
STD = sólidos totais dissolvidos
STV = sólidos totais voláteis
SV = sólidos voláteis
 $t_{1/2}$ = tempo de meia vida
TAG = triglicerídeo
TDH = tempo de detenção hidráulico
TMM = taxa molar de metano
TRC = tempo de retenção celular
U = unidade enzimática
u = velocidade do fluido
UASB = *upflow anaerobic sludge blanket*
UHT = temperatura ultra alta
UNICAMP = Universidade Estadual de Campinas
USP = Universidade de São Paulo
UV = ultra violeta
v = volume
VBG = volume de biogás
 V_d = velocidade de degradação da enzima
 $V_{máx}$ = velocidade máxima reacional
 $V_{máx,0}$ = velocidade máxima reacional inicial
YM = rendimento de metano
 μL = microlitro

5.1. Fluxograma experimental	78
5.2. Material	80
5.2.1. <i>Biomassa fúngica</i>	80
5.2.2. <i>Meio de cultura</i>	80
5.2.3. <i>Fonte de substrato</i>	81
5.2.4. <i>Lodo Anaeróbio</i>	81
5.2.5. <i>Suporte de imobilização</i>	82
5.2.6. <i>Reatores</i>	82
5.3. Metodologia experimental	85
5.3.1. <i>Preparação e imobilização das células íntegras</i>	85
5.3.2. <i>Determinação da atividade enzimática das células íntegras</i>	86
5.3.3. <i>Extração líquido-líquido de lipídeos utilizando diferentes solventes para avaliação qualitativa via cromatografia gasosa (GC-FID)</i>	87
5.3.3.1. <i>Análise das frações de lipídeos via cromatografia gasosa GC-FID</i>	88
5.3.4. <i>Reação de hidrólise da água residuária da indústria de laticínio contendo lipídeos por catálise básica</i>	88
5.3.5. <i>Metil esterificação de ácidos graxos com solução de diazometano</i>	90
5.3.6. <i>Determinação da constante de desativação enzimática e tempo de meia vida das lipases produzidas via cultivo celular</i>	90
5.3.7. <i>Avaliação da biodegradabilidade da água residuária da indústria de laticínio em reatores batelada</i>	92
5.3.8. <i>Teste hidrodinâmico dos reatores contínuos de fluxo ascendente</i>	93
5.3.9. <i>Sequenciamento genômico para identificação taxonômica da comunidade microbiana dos reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos</i>	95
5.4. Metodologia analítica	96
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
6.1. Avaliação da eficiência da extração líquido-líquido na análise cromatográfica de lipídeos	99
6.1.1. <i>Cromatografia gasosa (GC-FID)</i>	99
6.1.2. <i>Avaliação da eficiência da extração líquido-líquido de lipídeos utilizando diferentes solventes orgânicos</i>	102
6.1.2.1. <i>Derivatização das amostras contendo lipídeos com solução de diazometano</i> 105	
6.1.3. <i>Catálise básica da água residuária da indústria de laticínio</i>	107
6.2. Determinação da atividade lipolítica das células íntegras de <i>P. citrinum</i>	109
6.3. Avaliação da constante de desativação e tempo meia vida enzimática	111
6.4. Ensaios preliminares da hidrólise enzimática associada à metanogênese	114
6.5. Influência da ausência de oxigênio molecular na hidrólise enzimática da AR de laticínio utilizando células íntegras de fungos filamentosos de <i>Penicillium citrinum</i>.	124

6.6. Hidrólise enzimática em reator contínuo de fluxo ascendente utilizando biomassa fúngica.....	130
6.7. Avaliação dos efeitos do pré-tratamento da água residuária de laticínio com células íntegras do fungo filamentosso <i>Penicillium citrinum</i> na biodigestão anaeróbia para formação de metano e remoção de DQO.....	143
6.7.1. <i>Biodigestão anaeróbia da água residuária bruta de laticínio</i>	143
6.7.2. <i>Biodigestão anaeróbia da água residuária de laticínio pré-tratada com células íntegras do fungo filamentosso <i>Penicillium citrinum</i></i>	155
6.7.3.1. <i>Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com biomassa fúngica na produção de metano</i>	162
6.8. Avaliação taxonômica da comunidade microbiana dos reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos	166
6.8.1. <i>Avaliação da pureza e concentração dos fragmentos de DNA genômico extraídos das amostras ambientais microbianas.....</i>	166
6.8.2. <i>Avaliação do sequenciamento genômico para identificação das bactérias e arqueias presentes ao final da operação dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos</i>	168
6.8.3. <i>Avaliação do sequenciamento genômico para identificação das bactérias e arqueias presentes ao final da operação dos reatores contínuos metanogênicos.....</i>	175
6.9. Avaliação hidrodinâmica dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos e metanogênicos	185
6.9.1. <i>Avaliação hidrodinâmica dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos</i>	185
6.9.2. <i>Avaliação hidrodinâmica dos reatores contínuos metanogênicos</i>	188
7. CONCLUSÕES	191
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	194
REFERÊNCIAS	196
APÊNDICE A:	222
APÊNDICE B:	228
ANEXO A:	233
ANEXO B:.....	234

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O descarte dos efluentes da indústria de produtos lácteos, sem tratamento prévio, apresentam significativa contribuição em relação à poluição hídrica, principalmente no que diz respeito à alta concentração de matéria orgânica (MO) associada (DOMINGUES et al., 2015; SARAIVA; PEREIRA, 2009). Destacam-se as proteínas, os carboidratos e os lipídeos como principais constituintes da água residuária (AR) da indústria de laticínios e derivados do leite (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

A indústria de laticínio é considerada uma das maiores fontes de geração de ARs dentre os demais segmentos do setor alimentício. Além do potencial poluidor, observa-se elevada quantidade de efluente gerado por volume de leite processado. São constatados até 06 litros de efluente para cada litro de leite (DOMINGUES et al., 2015). Segundo Slavov (2017), a grande variedade de laticínios pressupõe a existência de muitos tipos de efluentes. No entanto, podem ser observadas três categorias principais, descritas de acordo com sua origem e composição: a água de processamento, a água de limpeza e o esgoto sanitário (METCALF; EDDY, 2016).

Em função da grande heterogeneidade e número de empresas atuantes no segmento de produtos lácteos, de acordo com o anuário leite 2022, foram estimados volume de leite processado de aproximadamente 35,5 bilhões de litros (EMPRAPA GADO DE LEITE, 2022). Este montante contribui com a geração de quantidade significativa de AR em consequência do beneficiamento de leite e a produção de seus derivados.

Segundo Mendes (2004), as ARs provenientes da fabricação de queijos e derivados apresentam Demanda Química de Oxigênio (DQO) média de 50 g/L, dos quais mais de 0,8 g/L podem ser atribuídos à presença de lipídeos. Quando lançados sobre os cursos hídricos, os lipídeos formam finas camadas superficiais, impedindo a difusão de oxigênio (O₂) da atmosfera (atm) para o meio líquido, o que pode provocar mortandade da vida aquática (MENDES, 2004).

Águas residuárias com elevados teores de lipídeos apresentam vários entraves para o desenvolvimento do processo de digestão anaeróbia (DA) convencional (METCALF; EDDY, 2016). São observados a flotação de camadas de escumas na superfície dos reatores biológicos; a colmatação de elementos do sistema; a geração de odores desagradáveis; longos períodos requeridos na partida do processo, relacionado à degradação complexa dos lipídeos e necessidade de adaptação preliminar da biomassa;

queda do potencial hidrogeniônico (pH); toxicidade aos microrganismos acetogênicos e metanogênicos, além do crescimento de microrganismos filamentosos (MENDES; PEREIRA; CASTRO, 2006; METCALF; EDDY, 2016; SLAVOV, 2017).

No início do novo milênio foi dada atenção ao uso da tecnologia enzimática como etapa de pré-tratamento de ARs, entretanto, apesar dos importantes resultados obtidos, poucos são os relatos encontrados na literatura científica. Neste contexto, a biodegradação de lipídeos por meio da utilização de lipases, para promoção da reação de hidrólise, vem mostrando-se cada vez mais promissora no pré-tratamento de efluentes com elevados teores de lipídeos (ALVES, 2018; CAMMAROTA; FREIRE, 2006; JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI; DEBOWSKI, 2008; MENG et al., 2015).

Pertencente ao grupo de enzimas hidrolíticas, as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são responsáveis pela catálise da hidrólise de ligações éster-carboxílicas de acilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol (ARAÚJO et al., 2016). Graças ao desenvolvimento da biotecnologia, o cultivo de células íntegras, empregando-se o método de fermentação submersa sob agitação circular, tem potencial para dispensar as onerosas etapas de extração e purificação de enzimas, requeridas no processo de biocatálise convencional, que representam até 70% do custo total de produção enzimática (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

O cultivo de células íntegras de fungos filamentosos, produtores de enzimas hidrolíticas como biocatalisadores ativos e estáveis, via processos de baixo custo, se apresenta como alternativa para o complemento aos processos convencionais de tratamento de ARs, tais como a DA que produz metano (CH_4), composto de elevado valor energético, como produto (ALVES et al., 2019).

As vantagens deste tipo de sistema de tratamento compreendem o controle de produtos, não geração de subprodutos tóxicos, condições de operação próximas a ambiente e redução de custos em termos de energia e de equipamentos, além de ser um processo muito atrativo do ponto de vista ambiental (MASSE; KENNED; CHOU, 2001).

Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar os efeitos do pré-tratamento enzimático, com a utilização de células íntegras, sobre o efluente da indústria de laticínio e, posterior, realização da digestão anaeróbia em reator metanogênico estruturado de fluxo ascendente.

1.1. Estrutura da Tese

A presente tese foi estruturada em 8 capítulos. Nos capítulos introdutórios, foram abordados aspectos relacionados ao tema, incluindo a presente introdução e justificativa (capítulo 1), a fundamentação teórica (capítulo 2), a definição de premissas e hipóteses (capítulo 3) e os objetivos deste trabalho (capítulo 4).

No capítulo 5 são apresentados os materiais e métodos utilizados para o teste das hipóteses e alcance dos objetivos propostos. No capítulo 6 são apresentados os resultados obtidos e as discussões pertinentes à luz dos fundamentos e literatura consultada.

Os capítulos 7 e 8 compõem os capítulos finais da pesquisa, representados pelas principais conclusões observadas, a partir dos resultados obtidos, e as sugestões para futuros trabalhos sobre o tema pesquisado, respectivamente.

Ao final, são apresentadas as referências bibliográficas consultadas e citadas na presente tese, além dos apêndices e anexos, em complemento ao texto principal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

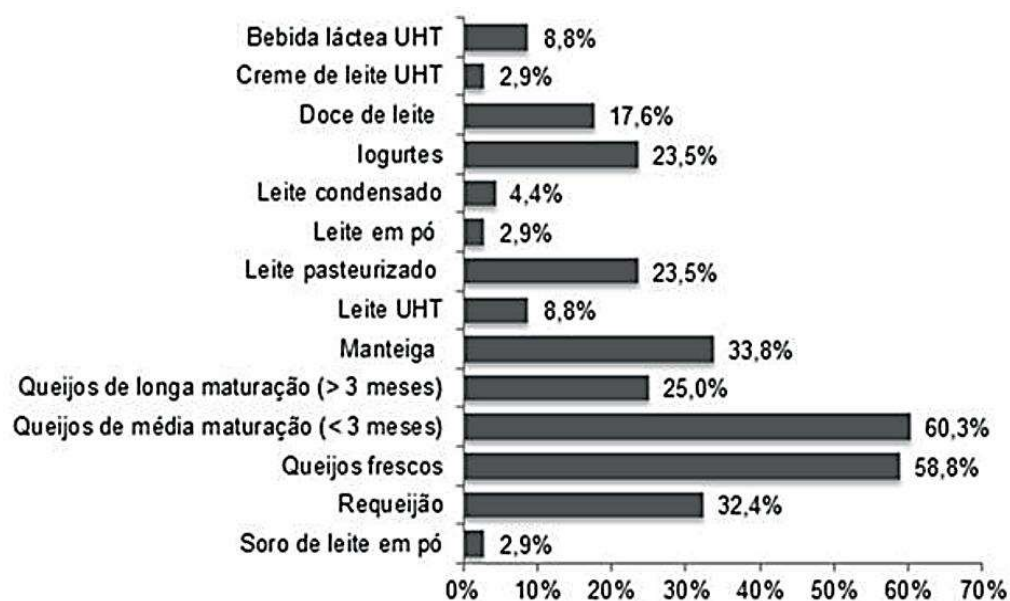
A revisão bibliográfica apresenta a abordagem sobre o leite e as indústrias de laticínios no Brasil; a caracterização do efluente obtido em consequência da produção de queijo e seus derivados; o processo de digestão anaeróbia visando a produção de biogás com base na literatura fundamental e atual; os problemas encontrados pelo tratamento anaeróbio associado ao efluente da indústria de laticínio e o desenvolvimento de alternativas para o emprego de biocatalisadores no pré-tratamento de efluentes.

2.1. Indústria de Laticínio

No ano de 2016, o Brasil foi classificado como o quarto maior produtor mundial de leite, com 35 bilhões de litros/ano (ZOCCAL, 2017). Em 2015, a produção de leite *in natura* representou 5,8% do valor bruto da produção agropecuária brasileira, com o leite entre as seis mais importantes atividades agropecuárias do País (MAPA, 2019). A produção de leite *in natura* está concentrada, principalmente, nas regiões Sul (34,7%), Sudeste (34,6%), Centro-Oeste (14,1%), Nordeste (11,1%) e Norte (5,5%) do país (IBGE, 2016). Na análise estadual, os estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás são os seis maiores produtores leite *in natura* e correspondem a 84,02% da produção do território nacional (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2018).

O leite é um alimento rico em nutrientes como o cálcio, a vitamina B2, a vitamina B6, a vitamina B12, a vitamina A, a tiamina e minerais (ZOCCAL, 2017). A Figura 1 apresenta os principais produtos do setor lácteo brasileiro e sua respectiva porcentagem de fabricação em relação ao número de laticínios existentes.

De acordo com a Figura 1, a maioria dos laticínios em atividade produzem queijos frescos e/ou queijos de média maturação, 58,8 e 60,3%, respectivamente. Fato esse atribuído a estes produtos demandarem baixo nível de investimento em infraestrutura, equipamento e tecnologia, além de não necessitarem de capital de giro elevado para manter o negócio. Na produção de queijos de longa maturação, há a necessidade de formação de elevados estoques até que os produtos comecem a serem vendidos (LIMA; PEREZ; CHAVES, 2017b).

Figura 1 - Principais produtos lácteos em relação ao número de laticínios existentes.

Fonte: adaptado de Lima; Perez & Chaves (2017b).

A produção de produtos que requerem processos de maior tecnologia, como o processo UHT (*ultra high temperature* ou temperatura ultra alta), exemplificado pela produção de bebida láctea e do creme de leite e produtos que requerem processos de secagem e desidratação, como o leite condensado e o leite/soro em pó, estão concentrados em poucos laticínios, menos de 9% do total. Uma das razões para tal se dá ao fato de que são poucas as empresas com capital disponível para investir em tecnologias de processamento mais caras (LIMA; PEREZ; CHAVES, 2017b).

As Tabelas 1 e 2 mostram o ranking das 10 maiores empresas de laticínios presentes no Brasil, no ano de 2017.

Tabela 1 - Ranking das 10 maiores empresas de laticínios do Brasil - 2017.

Class.	Marca	Volume de leite (L)	Nº de produtores	Litros de leite por produtor/dia
1º	Nestlé	1.694.400	3.898	735
2º	Lat. Bela Vista	1.322.328	6.633	358
3º	Unium	1.139.657	1.520	1.222
4º	CCPR/Itambé	995.653	4.314	595

Fonte: adaptado de Leite Brasil (2018).

Tabela 2 - Ranking das 10 maiores empresas de laticínios do Brasil – 2017 (continuação).

Class.	Marca	Volume de leite (L)	Nº de produtores	Litros de leite por produtor/dia
5º	Embaré	569.285	1.667	627
6º	Aurora	488.000	5.520	235
7º	CCGL	439.073	4.302	278
8º	Jussara	394.732	3.495	232
9º	Danone	378.651	213	2.294
10º	Vigor	312.675	1.184	588
Total	-	7.734.454	32.746	7.164

Fonte: adaptado de Leite Brasil (2018).

As 13 maiores empresas do setor concentraram 38,1% de toda a captação formal de leite cru (MILKPOINT, 2015). Das indústrias de laticínios localizadas em território nacional, 75,0% atuam em nível nacional, 10,3% atuam no próprio Estado, 8,8% atuam em outros Estados e apenas 5,9% possuem atuação nacional e internacional (LIMA; PEREZ; CHAVES, 2017b). De acordo com o número de funcionários, ainda segundo Lima, Perez e Chaves (2017b), o setor de laticínio é marcado pela grande concentração de empresas micro e pequeno porte, representando 77,9% do total, o que corrobora com os estudos realizados por Ferreira, Abrantes e Perez (2008) e Brunozi Júnior et al. (2012).

2.1.1. Efluente da Indústria de Laticínio

A indústria de laticínio é considerada uma das maiores fontes de geração de ARs dentre os demais segmentos do setor alimentício. Fato atribuído à rápida industrialização e ao crescimento da taxa de produção de leite, aproximadamente 2,8% a.a. (BRITZ et al., 2006; NADAIS et al., 2010).

A água tem papel fundamental no beneficiamento e processamento do leite, sendo encontrada em cada linha de produção, incluída, também, em processos de limpeza, desinfecção, aquecimento e resfriamento (BRITZ et al., 2006). Proveniente do processo produtivo e atividades sanitárias, em fábrica de produtos lácteos, a água contaminada atinge cerca de 50 a 80% da água total consumida pela unidade. A maior parte das ARs geradas são provenientes dos processos de fabricação (SLAVOV, 2017).

Os despejos da indústria de laticínios são provenientes da água utilizada em processos de lavagem, juntamente com detergentes e desinfetantes, da limpeza e sanitização de tanques e dutos de leite, equipamentos de ordenha e dos silos. Resíduos de análises do laboratório do controle de qualidade, poeiras e areia removidos da lavagem de pisos, resíduos de lubrificantes utilizados em equipamentos e subprodutos da fabricação de produtos lácteos, como soro de leite, são contabilizados. Soma-se, também, à contribuição do esgoto sanitário (BRITZ et al., 2006; SLAVOV, 2017).

A quantidade e as características das ARs, geradas em indústria de produtos lácteos, dependem amplamente de fatores como o tamanho da unidade fabril, do perfil e da capacidade da empresa, da tecnologia de produção, do tipo de equipamento utilizado, do grau de reutilização de AR, da perda de matérias-primas, da gestão de resíduos, da eficácia/complexidade dos métodos de limpeza e desinfecção, de boas práticas de fabricação, entre outros. Todos esses fatores fazem com que a real concentração dos poluentes presentes nos efluentes de produtos lácteos variem muito de empresa para empresa (BELLA; RAO, 2021; BRITZ et al., 2006; KARADAG et al., 2015; NADAIS et al., 2010; SLAVOV, 2017).

Segundo Slavov (2017), a grande variedade de laticínios pressupõe a existência de muitos tipos de efluentes. No entanto, podem ser observadas três categorias principais, descritas de acordo com sua origem e composição: a água de processamento, a água de limpeza e o esgoto sanitário.

A água de processamento é formada nas etapas de resfriamento do leite, em refrigeradores e condensadores especiais; a água do resfriamento de produtos durante o processo de pasteurização; água proveniente do enxague de garrafas na linha de produção e condensados gerados em instalações a vácuo (SLAVOV, 2017). Em geral, essa categoria apresenta reduzida carga de poluentes e, após tratamento mínimo, está apta a ser reutilizada ou descarregada juntamente com a água pluvial (BRITZ et al., 2006). A reutilização da água de processamento é possível para instalações que não estão em contato direto com produtos ou subprodutos derivados do leite (SLAVOV, 2017).

A água de limpeza é proveniente da lavagem de equipamentos que estejam em contato direto com o leite ou produtos de laticínios, destacando-se, também, o derramamento de leite e seus derivados, o soro de leite formado como subproduto do processo de fabricação de derivados do leite, a água presente nas etapas de prensagem e salmoura, os efluentes do mau funcionamento de equipamentos e até erros operacionais

(SLAVOV, 2017).

O leite e os resíduos da etapa de fabricação de produtos lácteos, como pedaços de queijo, soro de leite, creme de leite, água de separação, culturas iniciais, iogurte, concentrados ou estabilizadores de frutas, são responsáveis por mais de 90% dos sólidos orgânicos presentes nos efluentes deste segmento. Estes efluentes são produzidos em grandes quantidades e possuem elevado potencial poluidor, exigindo tratamento adicional (SLAVOV, 2017). Assim, o soro de leite torna-se o principal poluente das ARs geradas pelo processamento do leite para produção de seus derivados, devido, principalmente à sua elevada carga orgânica e volumétrica associada, representando cerca de 85-95% do volume de leite *in natura* e até 55% dos seus constituintes de origem (BELLA, RAO, 2021; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013).

O soro de leite é constituído de carboidratos, principalmente a lactose, proteínas, ácido láctico, gorduras e sais e é produzido na fabricação de queijos, cujo volume depende da produtividade do queijo e o tipo de leite processado, podendo ser bovino, caprino, de ovelhas, e afins (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; FARIZOGLU et al., 2007; GANNOUN et al., 2008; PESTA; MEYER-PITTROFF; RUSS, 2007; VENETSANEAS et al., 2009).

Segundo Parzianello (2011), a maior parte das ARs geradas nos laticínios são destinadas à alimentação animal. Aliado a isso, cerca de 50% do efluente gerado pela produção mundial de soro de leite, principalmente no que diz respeito ao soro de leite ácido não possui nenhum tipo de tratamento prévio antes de seu descarte, maximizando os impactos associados ao meio ambiente (NAJAFPOUR et al., 2008; SADDOUD; HASSAÏRI; SAYADI, 2007). De acordo com Domingues et al. (2015), as indústrias de laticínios geram, aproximadamente, 03 a 06 litros de efluente por litro de leite processado. Já nos estudos realizados por Carvalho, Prazeres e Rivas (2013) e por Rosenwinkel, Austermann-Haun e Meyer (2005), foram encontrados quantidade de água residual de aproximadamente 2,5 vezes superior ao do leite processado em unidades de volume.

O esgoto sanitário é encontrado em banheiros, chuveiros, e em outras etapas de higienização pessoal presentes nas indústrias. Estes são similares em composição com as ARs municipais e, geralmente, são canalizadas diretamente para redes de esgoto municipais (BRITZ et al., 2006; ROSENWINKEL; AUSTERMANN-HAUN; MEYER, 2005; SLAVOV, 2017).

Levando-se em conta as restrições financeiras apresentadas pelas indústrias de

médio e pequeno porte do segmento lácteo, muitas indústrias lançam seus efluentes na rede pública de coleta de esgoto ou diretamente em cursos d'água sem nenhum tipo de tratamento prévio. Neste contexto, há contribuição relevante em relação à poluição hídrica, principalmente no que diz respeito à carga orgânica associada a este tipo de efluente, em torno de 50 g DQO/L, com teor de lipídeos superior a 800 mg/L (MENDES, 2004). Tais ocorrências vão em contramão com as políticas de controle ambiental e o princípio da sustentabilidade.

2.1.1.1. Características físico-químicas das águas residuárias da indústria de laticínios

Em virtude da alta concentração de lipídeos, o efluente da indústria de produtos lácteos é rico em nutrientes e moléculas orgânicas que não são prontamente biodegradáveis, o que os torna uma ameaça ao equilíbrio ambiental, especificamente de coleções hídricas (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

A Tabela 3 apresenta a composição média de diferentes produtos do processamento do leite.

Tabela 3 - Composição média da água residuária gerada no processamento do leite, da manteiga, do soro de leite e da fabricação de sorvete.

Efluente	Matéria seca (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Lactose (%)	DQO (g/kg)	DBO_u (g/kg)
Leite	11,5-12,5	3-4	3,3	4,7	192,9-218,6	135-156,2
Manteiga	7,7-8	0,4-0,86	3	4	104,5-111,9	72-75,1
Soro de leite	6-6,2	0,05-0,2	0,75-1,0	4,5-4,8	72-77	51,6-55,9
Sorvete	40,4-43	33-35	2	3	871-936,5	695-747

Fonte: Adaptado de Slavov (2017).

As principais características físico-químicas das ARs de produtos lácteos, de forma geral e presentes na literatura, podem ser visualizados conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Características físico-químicas do efluente da indústria de produtos lácteos.

Características	Média	Faixa
DBO ₅ (mg/L)	2.300	40 – 48.000
DQO (mg/L)	4.500	80 – 95.000
DBO ₅ / DQO	0,53	0,11 – 0,90
pH	4,8	4,0 – 9,4
Lipídeos (mg/L)	7.000	400 – 15.000
ST (mg/L)	2.450	135 – 85.000
SS (mg/L)	816	24 – 4.500
STV (mg/L)	1.093	6 – 5.360
Temperatura (°C)	32	18 – 52
Nitrogênio (mg/L)	56	15 – 180
Fósforo (mg/L)	33	12 – 132

Fonte: Adaptado de Alves (2018).

O efluente da indústria de laticínio apresenta grande variação de pH, podendo ser ácido ou alcalino, em função do uso de compostos químicos sanitizantes nas operações de limpeza, concentração de elementos orgânicos e a presença de nutrientes (BYLUND, 2003). Normalmente, são de natureza álcali ou neutros, entretanto, a fermentação dos elementos da AR de laticínio tende a tornar o meio ácido, rapidamente (DEMIREL; YENIGUN; ONAY, 2005; KASAPGIL; ANDERSON; INCE, 1994).

A elevada carga orgânica atribuída às ARs de laticínios resulta em elevadas concentrações de DQO e DBO que, em estações de tratamento, representam baixa assimilação de proteínas/gorduras e elevada assimilação de carboidratos. A razão DBO₅/DQO expressa o potencial de tratabilidade da AR por processos biológicos, variando entre 0,5 e 0,8 para a AR de produtos lácteos, o que indica elevada fração biodegradável (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; WATKINS; NASH, 2010). Contribuindo para os elevados valores de DQO para a AR de laticínio, ainda, podem ser encontrados sólidos suspensos e dissolvidos, cloretos, sulfatos, compostos de nitrogênio e fósforo (BRITZ et al., 2006; KUSHWAHA; SRIVASTAVA; MALL, 2011; SENGIL; OZACAR, 2006).

A fração de lipídeos compreende os óleos, graxas, gorduras e os ácidos graxos livres, o que, juntamente com as proteínas e lactose, compõem os principais compostos orgânicos presentes neste tipo de água residuária (MENDES, 2004). A Tabela 5

apresenta os valores das concentrações de lipídeos em ARs de laticínios e suas principais fontes de geração.

Tabela 5 - Concentração de lipídeos em águas residuárias e suas principais fontes de geração.

Efluentes	Concentração de Lipídeos (mg/L)
Restaurantes	98
Doméstico	40 – 100
Matadouros	Acima de 500
Sorvetes	845
Laticínios	4.680
Óleos comestíveis	16.000

Fonte: adaptado de Mendes (2004).

De acordo com o processo empregado na cadeia produtiva, a qualidade da matéria prima utilizada e as condições de operação, a relação entre os constituintes da água residuária pode ser extremamente variável, o que, aliado à temperatura, causa suscetibilidade ao tratamento biológico (JANCZUKOWICZ; ZIELIŃSKI; DĘBOWSKI, 2008).

2.2. Digestão Anaeróbia

Nos sistemas de tratamento de ARs, podem ser encontradas operações mecânicas e processos físico-químicos e biológicos. O tratamento por operações mecânicas se faz necessária para a equalização das mudanças volumétricas e dos fluxos de massas, também atuando na redução de sólidos em suspensão (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998).

O tratamento físico-químico é eficaz na remoção de compostos emulsionados, porém, os custos associados com a aquisição de reagentes químicos e a geração de sólidos devem ser considerados, o que torna o sistema de tratamento mais oneroso. Outra desvantagem relatada pelos métodos físico-químicos é baixa remoção da DQO alcançada. Os processos biológicos são os preferidos, uma vez que as ARs apresentam, geralmente, elevado teor de MO altamente biodegradável (METCALF; EDDY, 2016).

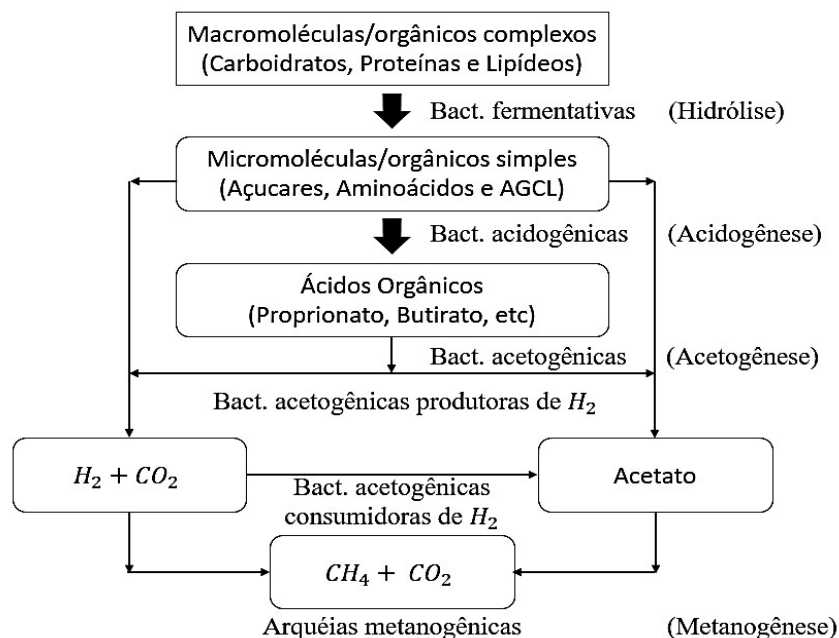
Para o descarte correto de seus efluentes, as indústrias de laticínios devem implantar um programa de controle racional de seus resíduos, com o objetivo de evitar

futuros problemas relacionados à poluição. No entanto, os resíduos de origem animal apresentam elevados valores energéticos, viabilizando o emprego de sistema de tratamento que faça proveito de suas características, reduzindo os custos de produção e minimização dos impactos ambientais ligados ao descarte destes dejetos (COSTA, 2009). A DA é uma alternativa viável para mitigação de efeitos ambientais adversos e para o aproveitamento energético do efluente da indústria de laticínio, associado.

Utilizada por humanos há séculos, a DA é considerada uma ferramenta importante para a geração de energia renovável. A teoria subjacente da DA não é recente, sendo estabelecida por décadas. No entanto, muitas pesquisas atuais são direcionadas para a otimização da DA sob diversas condições ambientais e nutricionais, retomando o interesse de pesquisa nesta área.

Conforme mostra a Figura 2, o processo de DA ocorre em quatro etapas sucessivas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. A DA é extremamente dependente das interações entre os diversos microrganismos capazes de realizar tais etapas (METCALF; EDDY, 2016; VERMA, 2002; VON SPERLING, 1998).

Figura 2 - Esquema simplificado das etapas da digestão anaeróbia.



Nas últimas décadas, o tratamento de águas residuárias por processo anaeróbio tem se tornado mais atrativo em relação aos processos aeróbios tradicionais. Fatores como o potencial de produção de biogás, menor geração de lodo e biomassa, menor área requerida e menor demanda energética, são algumas de suas vantagens (METCALF;

EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998).

2.2.1. *Hidrólise*

Devido à complexidade dos constituintes das ARs, encontrados nos digestores anaeróbios, alinhado com a possível incapacidade metabólica das bactérias e arqueias frente à presença de compostos orgânicos complexos, faz-se necessária a quebra das macromoléculas orgânicas complexas, pelo processo de hidrólise, em moléculas orgânicas simples, que por sua vez podem ser utilizadas pelas bactérias acidogênicas (GUJER; ZEHNDER, 1983).

Na etapa de hidrólise, as bactérias hidrolíticas, geralmente as hidrolíticas fermentativas, secretam enzimas extracelulares capazes de converter os carboidratos, proteínas e lipídeos em açúcares, aminoácidos e AGCL, respectivamente (LI; PARK; ZHU, 2011). Após a clivagem enzimática das macromoléculas orgânicas complexas, os produtos da hidrólise estão aptos a se difundir através das membranas celulares dos microrganismos acidogênicos (VAN LIER; MAHMOUD; ZEEMAN, 2008).

Em várias pesquisas envolvendo o processo de digestão anaeróbia, pode-se observar que a etapa de hidrólise pode ser tão limitante, para o processo global, como a etapa de metanogênese, a depender da complexidade dos constituintes da água residuária utilizada, concentração da MO e da razão entre os microrganismos hidrolíticos e os microrganismos metanogênicos envolvidos (LUO et al., 2012; MA et al., 2013). Atribuído a este fato, muita atenção é dada para o desenvolvimento de métodos que visam acelerar a hidrólise em digestores anaeróbios, mostrando a importância da hidrólise na cinética da digestão anaeróbia, principalmente quando se trabalha com efluentes fortemente lignocelulósicos e/ou lipídicos (ALVES et al., 2019; KUMAR; SHARMA, 2017).

Segundo a literatura, de modo geral, a hidrólise enzimática apresenta elevada atividade na faixa de temperatura entre 30-50°C e faixa de pH de 5 a 8 (AZMAN, 2016). Temperaturas demasiadamente elevadas e pHs fortemente ácidos, ou básicos, podem causar a desnaturação total da estrutura das enzimas, causando a perda de sua função (NELSON; COX, 2017).

2.2.2. Acidogênese

Após a difusão dos produtos da hidrólise através das membranas celulares dos microrganismos acidogênicos, estes são convertidos a ácidos graxos e outros produtos. Os ácidos graxos constituem uma classe de ácidos orgânicos, como acetato, propionato e o butirato, também podendo estar presente quantidades menores de lactato (BERGMAN, 1990; MEEGODA et al., 2018; VAN LIER; MAHMOUD; ZEEMAN, 2008).

As condições de operação, oferecidas pelo digestor, e as características do meio reacional, apresentam influência significativa sobre as concentrações específicas de intermediários produzidos na etapa de acidogênese. As concentrações de ácidos graxos podem flutuar significativamente para digestores operando em pHs e cargas diferentes (HUANG et al., 2015; WU; YAO; ZHU, 2010).

Dentre as etapas da digestão anaeróbia, acredita-se que a etapa de acidogênese é a que ocorre a uma taxa mais rápida (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2008). Dinopoulo, Sterritt e Lester (1988b) relatam tempos de duplicação das bactérias acidogênicas menores que 02 horas. Embora a produção de ácidos graxos crie precursores diretos para as etapas de acetogênese e metanogênese, caso seu consumo não ocorra, a acidificação do digestor pela elevada concentração de ácidos graxos é amplamente relatada como causa falha do digestor anaeróbio (AKUZAWA et al., 2011).

Em AR com elevado teor de proteínas como a AR de laticínio, a produção de ácido graxo deve ser considerada. Os aminoácidos presentes na AR, geralmente, são degradados a ácidos graxos através da reação de *Stickland* (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2008; KOVÁCS et al., 2013). A reação de *Stickland* é caracterizada pela fermentação acoplada de aminoácidos (produtos da hidrólise das proteínas). Nessa situação, um aminoácido atua como doador de elétrons, sendo oxidado, enquanto o outro atua como receptor de elétrons, sendo reduzido, formando amônia (NH₃), dióxido de carbono (CO₂) e um ácido carboxílico com um carbono a menos que o aminoácido oxidado. Este tipo de metabolismo está presente em microrganismos como os *Clostrídios* (MADIGAN et al., 2016).

Vale destacar que a amônia produzida pela quebra dos aminoácidos, em concentrações suficientemente elevadas, pode atuar como agente inibidor da DA (KOVÁCS et al., 2013; PARK; PARK; KIM, 2014).

2.2.3. Acetogênese

Uma elevada quantidade de ácidos graxos, fruto da etapa de acidogênese, não está diretamente acessível às arqueias metanogênicas. Deste modo, na etapa de acetogênese, os ácidos graxos intermediários são convertidos em acetato, havendo também a produção de hidrogênio (H₂) (HANSEN; CHEONG, 2013; VON SPERLING, 1998). O H₂ produzido, nesta etapa, é de fundamental importância para que a DA ocorra, abordando a discussão sobre a relação sintrófica observada no processo de DA – transferência de hidrogênio interespecies (METCALF; EDDY, 2016). Embora seja observado o aumento da concentração de H₂ na etapa de acetogênese, a pressão parcial excessiva se mostra deletéria para os microrganismos acetogênicos (DINOPOULOU; RUDD; LESTER, 1988a).

Devido à presença das arqueias metanogênicas hidrogenotróficas presentes no meio reacional, o H₂ produzido na etapa de acetogênese é rapidamente consumido, mantendo a pressão parcial de hidrogênio no nível favorável ao desenvolvimento da DA, principalmente à acetogênese, criando uma reação exergônica (METCALF; EDDY, 2016; STAMS; PLUGGE, 2009).

Os lipídeos passam por via separada da acetogênese, a via da acidogênese e β-oxidação (CIRNE et al., 2007; WENG; JERIS, 1976). Na β-oxidação, é observada a produção de uma molécula de ácido graxo com dois carbonos a menos e uma molécula de acetato durante a degradação de uma molécula de AGCL (WENG; JERIS, 1976). Ainda nesta etapa, são liberados quatro íons hidrogênio e quatro elétrons, conforme apresentado pela Equação 1 (MENDES, 2004; WENG; JERIS, 1976).



Os elétrons produzidos são, então, transportados no interior das células microbianas como a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e a flavina adenina dinucleotídeo (FADH), os quais serão armazenados em aceptores de elétrons para a formação de duas moléculas de H₂, conforme mostra a Equação 2.



Ao final desta etapa, o H_2 produzido está disponível para ser consumido pelas bactérias homoacetogênicas e pelas arqueias metanogênicas hidrogenotróficas para produção de acetado e metano, respectivamente.

2.2.4. *Metanogênese*

Na etapa de metanogênese, o grupo de microrganismos anaeróbios estritos, representados pelas arqueias metanogênicas, metabolizam compostos simples de carbono, resultantes da degradação anaeróbia da MO, como o CO_2 e o acetato, produzindo biogás como resíduo da respiração (METCALF; EDDY, 2016; NARIHIRO; SEKIGUCHI, 2011, VON SPERLING, 1998).

Por metabolizarem uma gama restrita de substratos, a etapa de metanogênese é extremamente dependente dos microrganismos sintróficos, presentes no processo de digestão anaeróbia, os quais atuam degradando os compostos complexos em compostos simples de carbono, tornando-os acessíveis aos microrganismos metanogênicos (MADIGAN et al., 2016; NAKAYAMA et al., 2011).

As arqueias metanogênicas constituem sete ordens do filo *Euryarcheota*, a saber: *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanomassiliicoccales* e *Methanocellales* (LANG et al., 2015), o filo *Verstraetearchaeota* (VANWONTERGHEM et al., 2016) e o filo *Bathyarchaeota* (EVANS et al., 2015).

Diferentes vias da produção de metano realizadas pelos microrganismos metanogênicos são conhecidas (VON SPERLING, 1998). A via acetoclástica é desempenhada pelas arqueias da ordem *Methanosarcinales*, em que o acetato é clivado em dois grupos, um grupo carboxílico que é oxidado a CO_2 e um grupo metil que é reduzido a CH_4 (CONRAD, 2007). Normalmente, a via acetoclástica é responsável pela produção de dois terços de todo o metano produzido na etapa de metanogênese (BELAY; SPARLING; DANIELS, 1986; FOURNIER; GOGARTEN, 2008; LOVLEY; KLUG, 1983).

A via hidrogenotrófica é desempenhada pela maioria dos gêneros das arqueias metanogênicas, com exceção para a *Methanomassiliicoccales* (LANG et al., 2015). Nesta via, as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas reduzem o CO_2 a CH_4 utilizando, principalmente, o H_2 como doador de elétrons (METCALF; EDDY, 2016; NARIHIRO; SEKIGUCHI, 2011, VON SPERLING, 1998).

Compostos que possuem grupos metil em sua estrutura, como o metanol e as metilaminas, também podem ser utilizados como substratos pelas arqueias metanogênicas para a produção de CH₄ (BELAY; SPARLING; DANIELS, 1986; LIU; WHITMAN, 2008; LOVLEY; KLUG, 1983). Os microrganismos capazes de realizar tal via metabólica são denominados de metilotróficos, sendo pertencentes às ordens *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales* e a *Methanomassiliicoccales*, além do filo *Verstraetearchaeota* (VANWONTERGHEM et al., 2016).

Entre todos os microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia, os microrganismos metanogênicos são os que apresentam os maiores tempos de duplicação celular (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2008). Tal aumento do tempo de duplicação celular se deve ao crescimento mais lento em relação aos demais microrganismos das fases ácidas, podendo alcançar dias (8,3 dias) (LIU; WHITMAN, 2008). No entanto, são relatados que algumas espécies hidrogenotróficas, como a *Methanococcus maripaludis*, chegam a apresentar tempo de geração de apenas duas horas (RICHARDS et al., 2016).

Embora os microrganismos metanogênicos sejam classificados como o grupo de maior sensibilidade no processo de digestão anaeróbia, pesquisas recentes mostraram que o gênero de *Methanosarcina* sp pode ser capaz de suportar certos níveis de amônia, acetato e sódio, além de variações de pH, em níveis que seriam prejudiciais a outros microrganismos metanogênicos (DE VRIEZE et al., 2012).

2.3. Tratamento de efluentes com elevados teores de lipídeos

Nos sistemas de tratamento de ARs, a grande quantidade de lipídeos pode prejudicar o desenvolvimento do processo global devido ao potencial de flotação de camadas de espuma na superfície dos reatores, em função da baixa solubilidade dos lipídeos em água, além da solidificação desses lipídeos a baixas temperaturas, levando à colmatação de elementos do sistema e a geração de odores desagradáveis (MENDES; PEREIRA; CASTRO, 2006).

Nos últimos anos, a maioria dos sistemas de tratamento de ARs da indústria de laticínios em escala plena são processados por plantas aeróbias. Os métodos aeróbios mais comuns incluem lodos ativados (BELLA; RAO, 2021; SLAVOV, 2017), filtros aeróbios, lagoas aeradas, reatores em batelada sequenciais (RBS) (NECZAJ et al., 2008; SLAVOV, 2017) e reatores de membranas (MBR) (BELLA; RAO, 2021). Em se

tratando de AR com elevado teor de lipídeos, os sistemas aeróbios pistonados apresentam as melhores eficiências que os de mistura completa, fato este atribuído a menor sensibilidade às altas cargas orgânicas afluentes e ao controle do crescimento de bactérias filamentosas que, em excesso, prejudicam a sedimentabilidade e separação do lodo do efluente tratado (ROSENWINKEL; AUSTERMANN-HAUN; MEYER, 2005).

Apesar de apresentarem bons desempenhos quanto a remoção de MO, o sistema aeróbio apresenta limitada aplicação para esse tipo de efluente devido à elevada demanda energética requerida, limitações de transferência de oxigênio, produção de lodo acentuada, dificuldades na sedimentação de sólidos, além das bactérias aeróbias apresentarem menor eficiência na utilização de colóides quando comparadas com bactérias anaeróbias (ADULKAR; RATHOD, 2014; KARADAG et al., 2015; SLAVOV, 2017).

Os sistemas anaeróbios são os mais indicados para a utilização direta de AR de difícil degradação, além de serem menos dispendiosos do que os processos aeróbios, visto que os processos anaeróbios apresentam balanço energético mais favorável, menor produção de lodo e a geração de biogás (BRITZ et al., 2006; NADAIS et al., 2010). Entretanto, apesar da alta capacidade de tratamento de AR com elevada carga orgânica, os sistemas anaeróbios podem produzir odores desagradáveis e requererem etapa de pós-tratamento para adequação da qualidade do efluente. Porém, se operados e controlados adequadamente, tais odores podem ser minimizados (METCALF; EDDY, 2016).

Os principais problemas encontrados na aplicação do tratamento biológico anaeróbio de produtos lácteos incluem longos períodos na partida do processo, relacionado à degradação complexa do substrato e necessidade de adaptação preliminar da biomassa antes da utilização de proteínas e lipídeos (METCALF; EDDY, 2016; NARIHIRO; SEKIGUCHI, 2011, VON SPERLING, 1998). Outros fatores observados são a queda brusca de pH como consequência da alta concentração de lactose fermentável e baixa alcalinidade do substrato; lodo desintegrado e subsequente flotação de biomassa; presença de compostos inibitórios como os AGCL e os íons K^+ e Na^+ ; incapacidade de biotransformação da amônia e remoção de fósforo, além do manejo cuidadoso devido a maior sensibilidade a carga orgânica afluente aplicada e cargas de choque (SLAVOV, 2017).

Segundo Carvalho, Prazeres e Rivas (2013), no tratamento anaeróbio de AR de produtos lácteos, valores de DQO inicial aplicada acima de 5 g/L, geralmente, requerem

mais de 02 dias de tempo de detenção para a adequada DA de seus constituintes, podendo alcançar até 13 dias. Entretanto, a escolha do valor de tempo de detenção hidráulico (TDH) varia em função do tipo de reator empregado, volume útil disponível, tipo de substrato no afluente, condições ambientais e condições microbiológicas presentes (METCALF; EDDY, 2016).

Embora os reatores contínuos de tanque agitado (CSTR) sejam boas opções para pesquisas científicas envolvendo sistemas de mistura completa (USACK; SPIRITO, ANGENENT, 2012), sua aplicação mediante o emprego de AR de difícil degradação é dificultada. Tal fato se deve, principalmente, às restrições de TDHs apresentadas por essa configuração de reator e aos altos valores de TDHs requeridos para a degradação completa deste tipo de AR, quando comparados com os sistemas de fluxo pistonado (BRITZ et al., 2006; SLAVOV, 2017). Lebrato et al. (1990) estudaram o desempenho do reator CSTR, em escala de bancada, alimentado com o efluente da indústria de laticínio, constituído por água de lavagem e soro de leite (4:1), sob diferentes valores de TDHs. Segundo os autores, para a DQO afluente de 17 g/L, TDH de 9 dias, pH 7-7,4 e temperatura de 36°C, foram obtidos 90% de eficiência de remoção de DQO. Entretanto, foram verificados perda de biomassa quando empregados valores de TDHs abaixo de 9 dias, em sistema anaeróbio.

Mockaitis et al. (2006) estudaram os efeitos da carga orgânica aplicada, bem como o decréscimo da alcalinidade, para o tratamento do soro de leite, em reator anaeróbio do tipo RBS, em escala de bancada, contendo biomassa granular. Os reatores foram operados em ciclos de 8 horas com concentrações de DQO de 0,5, 1, 2 e 4 g/L, representando taxa de carga orgânica volumétrica (COV) de 0,6 a 4,8 g DQO/(L.dia). Eficiências de remoção de DQO acima de 90% foram obtidas, entretanto, a flotação da biomassa no emprego de cargas orgânicas mais elevadas de 2 e 4 g/L foram constatadas.

Em escala plena (tecnológica), os efluentes gerados em razão do processamento do leite são predominantemente tratados em reatores anaeróbios de fluxo ascendente (RAFAs) e filtros anaeróbios (FAs) (NADAIS et al., 2010). Devido à sua alta capacidade de floculação com elevada sedimentabilidade e compactação, o uso de reator RAFA apresenta condições favoráveis para o tratamento de efluentes com elevada carga orgânica (GAVALA et al., 1999a), como o efluente da indústria de laticínio (SLAVOV, 2017).

Nadais et al. (2005) estudaram os efeitos da aplicação de diferentes TDHs (6-16h), utilizando reatores RAFAs inoculado com lodo floculento, em escala piloto, para

o tratamento da AR de laticínio. Segundo os autores, foram alcançadas porcentagens superiores a 80% em relação a mineralização das proteínas, remoção de DQO solúvel e degradação de ácidos graxos. Ainda, pelo menos 60% de remoção de DQO foram observados mediante TDHs de 12h para COV aplicada de 2,5 g/(L.dia). Do 60° ao 70° dia de operação, foram observados o processo de granulação da biomassa.

Águas residuárias da indústria de laticínios com baixos teores de SST podem ser tratadas com sucesso em filtros anaeróbios (FAs) em todas as variações de escala (SLAVOV, 2017). Bonastre e Paris (1989) reportam faixa de remoção de DQO variando de 60 a 98%, em TDH de 12 a 48h e taxa de carga orgânica, expressa em DQO, de 1,7 – 20 kg/(m³.dia), para diferentes aplicações de filtros anaeróbios, em escala piloto e escala plena.

Cánovas-Diaz e Howell (1987) obtiveram resultados promissores no tratamento de soro de leite desproteínizado, na concentração de 59 gDQO/L, em reator de leito fixo (PBR) de fluxo descendente e em escala de bancada. Na taxa de carga orgânica de 12,5 kg/(m³.dia), pH neutro e temperatura de 30°C, foi possível degradar 90-95% da DQO inicial em TDH de 2-2,5 dias.

Há pouca informação sobre plantas anaeróbias de escala industrial utilizando soro de leite como principal substrato do processo de tratamento, porém, mais de 75% de remoção de DQO e cerca de 10 kgDQO/(m³.dia) de carga orgânica, expressas em DQO, foram alcançados, com o grau de biodegradação diretamente depende do TDH aplicado (DOBLE; KUMAR, 2005; DUGBA; ZHANG, 1999; NADAIS et al., 2010; PERLE; KIMCHIE; SHELEF, 1995; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

A Tabela 6 apresenta a síntese de alguns estudos de caso envolvendo o tratamento de efluentes da indústria de laticínios, apresentando o tipo de reator utilizado, parâmetros operacionais e a porcentagem de remoção de DQO obtida ao fim do processo de tratamento.

Destaca-se que fatores ambientais exercem grande influência no desempenho do processo de degradação da MO, como a temperatura, o pH, a capacidade alcalinizante do sistema, o TDH, a configuração do sistema, a solubilidade dos gases, a disponibilidade de nutrientes e a presença de compostos tóxicos/inibidores para o processo (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998).

Tabela 6 - Estudos de caso envolvendo o tratamento de águas residuárias da indústria de produtos lácteos.

Substrato	Reator	Condição	Escala	DQO _i (g/L)	pH	T(°C)	TDH (dia)	Carga (kg.m ³ /dia)	Remoção de DQO (%)	Referência
Soro de leite	RAFA	Anaeróbia	Bancada	57-60	6,6	35	10	1,5-1,9	81	Gavala et al. (1999b)
AR laticínio	PBR	Anaeróbia	Piloto	0,6	7,75	38	1	1-2	85	Debowski et al (2020)
Soro de leite diluído	CSTR	Anaeróbia	Bancada	10	7	55	10	0,95	94,6	Yang et al. (2003)
AR laticínio	CSTR-RAC	Anaeróbia	Piloto	3	8,2	38	1,6	1,25-4,50	82	Jurgensen et al. (2017)
Soro de leite	RBS	Anaeróbia	Bancada	38	5,5	55	8,3	1,5	87,4	Fernandez et al. (2015)
Soro de leite diluído	FA	Anaeróbia	Bancada	20	6,65	35	5	4	60	Jo, Kim e Lee (2016)
AR laticínio	FA	Anaeróbia	Piloto	2-6	6,8-7,2	32-34	0,9	6	85	Ince (1998)
AR laticínio	EGSB-PBR	Anaeróbia	Bancada	11,2	6,2-7,8	35	1,1	-	90	Mortezaei, Amani e Elyasi (2018)
Soro de leite sintético	MBBR	Aeróbia	Bancada	5,1-17	7-7,8	35	1	11,6	89	Rodgers et al. (2004)
Soro de leite reconstituído	RBS	Aeróbia	Piloto	2	7,3	20	4	0,78	98	Frigon et al. (2009)
Soro de leite	Lodos ativados	Aeróbia	Bancada	9,5	7	10-12	7,9	-	97	Rivas et al. (2010)

RAC = Reator Anaeróbio Compartimentado; CSTR ou RPA = Reator de Tanque com Agitação Contínua; EGSB ou RALGE= Reator Anaeróbio de Leito Granular Expandido; FA = Filtro Anaeróbio; MBBR = Reator Biológico de Leito Móvel; PBR = Reator Tubular com Recheio Inerte; RAFA = Reator Anaeróbio de Manta de Lodo e RBS = Reator em Batelada Sequencial.

Os trabalhos citados anteriormente e os apresentados na Tabela 6 referem-se a reatores em escala de bancada, piloto ou plena, em condições controladas, para o tratamento da AR de laticínio e suas variações. Os autores encontraram como gargalos a difícil assimilação de proteínas e lipídeos, relacionando a etapa de hidrólise com a etapa limitante para a produção de biogás e remoção de matéria orgânica deste tipo de AR. Assim, estudos envolvendo a etapa de hidrólise associada à biodigestão anaeróbia da água residuária de laticínios são requeridos e importantes para melhor desenvolvimento metabólico das comunidades microbianas, objetivando a remoção de DQO e formação de biogás.

2.4. Pré-tratamento de águas residuárias

Em virtude da elevada carga orgânica e da complexidade estrutural, muitas vezes apresentadas pelos constituintes das ARs de produtos lácteos, processos de diluição e aplicação do pré-tratamento devem ser considerados. Neste contexto, de acordo o método aplicado, os pré-tratamentos podem ser divididos em mecânicos, térmicos, químicos ou biológicos.

O pré-tratamento mecânico tem por principal objetivo a redução das partículas nos resíduos, provocando, de forma direta, aumento da área superficial das partículas (KUMAR; SHARMA, 2017). Nesse sentido, o pré-tratamento causado pelo emprego do ultrassom, em estudos científicos, é o método mais utilizado dentro desta categoria, em que a cavitação produzida é capaz de realizar a lise celular (CHU et al., 2002).

Segundo estudo realizado por Li et al. (2018), foi observado maior produção de biogás mediante o emprego do ultrassom a 20 kHz, por período de 80 min. Em períodos mais longos de sonificação, foi constatada maior redução dos sólidos voláteis (SV). Já no estudo realizado por Lima (2017a), o emprego do ultrassom na hidrólise enzimática de óleos vegetais, utilizando células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, foi capaz de provocar aumento de 38,6% para 77% nos rendimentos da reação hidrolítica, após período de 9 horas de tratamento mecânico.

Dentro do tratamento de AR, o emprego do pré-tratamento mecânico utilizando o método de colisão de placas tem atraído certa atenção nas pesquisas (MEEGODA et al., 2018). Nesse método, o lodo gerado, como resíduo do tratamento aeróbio, é jateado contra uma placa de esmagamento a alta pressão, causando a lise celular (MEEGODA et al., 2018; NAH et al., 2000). Segundo estudo realizado por Nah et al. (2000), o emprego

do método de pré-tratamento de colisão de placas foi capaz de reduzir o TDH de 13 para 6 dias, na DA do lodo, em reator CSTR em escala piloto, sem qualquer impedimento para a eficiência do processo de 30% de redução de SV.

O pré-tratamento térmico envolve a exposição dos resíduos a elevadas temperaturas e pressão, induzindo a hidrólise e evitando a evaporação (ARIUNBAATAR et al., 2014). Maiores carregamentos podem ser observados em digestores que incorporam este tipo de pré-tratamento (BARBER, 2016). Outra vantagem observada está relacionada ao aumento da estabilidade da digestão, uma vez que a hidrólise e a desintegração celular fazem com que haja a geração de lodo mais biodegradável (KEPP et al., 2000; EVERETT, 1972). No pré-tratamento térmico, a principal variável é a temperatura. Uma temperatura muito excessiva pode resultar na oxidação dos SV presentes na água residuária, esgotando os substratos prontamente biodegradáveis disponíveis para o processo de DA (ARIUNBAATAR et al., 2014).

Com o aumento da temperatura, aumentar-se-á solubilidade dos compostos no sistema reacional, como os carboidratos, as proteínas e os lipídeos presentes nas ARs de laticínios. Tal aumento de solubilidade pode causar o acúmulo de melanoidinas tóxicas no meio reacional, em consequência da reação de *Maillard*, trazendo sérios problemas para o processo da DA (DWYER et al., 2008). Pré-tratamento térmico em temperaturas mais baixas, cerca de 70°C, tem sido realizado, observando-se redução acentuada de patógenos nas ARs (FERRER et al., 2008; SKIADAS et al., 2005). Neste contexto, o tratamento térmico se apresenta como proposta interessante visando o reuso da água.

O pré-tratamento químico pode ser dividido em pré-tratamento ácido ou pré-tratamento básico (MEEGODA et al., 2018). Mediante a aplicação do tratamento ácido, pode ser evidenciado aumento da eficiência de degradação dos substratos, provocando redução do tempo necessário para a DA (ARIUNBAATAR et al., 2014). Entretanto, os custos associados ao emprego deste tipo de tratamento o tornam financeiramente menos eficazes quando comparados com o pré-tratamento alcalino (KUMAR; MURTHY, 2011).

O pré-tratamento alcalino, geralmente, emprega a utilização de amônia ou compostos de hidróxido (MAO et al., 2015), envolvendo reagentes menos cáusticos que os compostos ácidos. Outra vantagem associada baseia-se na realização deste tipo de pré-tratamento à temperatura ambiente (KIM; LEE; KIM, 2016). Como o processo de digestão anaeróbia, ocasionalmente, requer o emprego de reagentes alcalinos para o ajuste de pH do meio reacional, os métodos de pré-tratamento alcalinos são os

preferidos em relação ao emprego do pré-tratamento ácido (LI et al., 2012).

Ainda que este tipo de pré-tratamento (químico) apresente bons resultados, nos sistemas de tratamento de ARs por processos biológicos este não é muito aplicado, uma vez que dependendo dos constituintes químicos e suas concentrações, podem apresentar problemas de inibição aos microrganismos presentes, além do custo associado a aquisição de tais agentes químicos.

2.4.1. Pré-tratamento biológico

O pré-tratamento biológico é particularmente útil no aumento da hidrólise de compostos de estrutura complexa (MEEGODA et al., 2018). O princípio de pré-tratamento baseia-se na atuação de enzimas secretadas pelos agentes biológicos, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana como fungos e bactérias (MADIGAN et al., 2016). Os agentes biológicos atuam promovendo incremento da hidrólise enzimática dos compostos complexos ou recalcitrantes presentes nas ARs, muitas vezes inacessíveis aos microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia, em compostos de estrutura mais simples, que por sua vez se traduz em maior remoção de SV e aumento da produção de metano (GE; JENSEN; BATSTONE, 2010).

As enzimas produzidas pelos processos de fermentação podem, também, ser utilizadas como biocatalisadores para o pré-tratamento de AR complexas, como os efluentes lignocelulósicos (BOCHMANN et al., 2007) e os efluentes contendo elevada concentração de lipídeos, reduzindo-se o tempo requerido com a etapa de hidrólise em processo de DA convencional (ALVES et al., 2019).

Pesquisas envolvendo a utilização de biocatalisadores enzimáticos em processos de tratamento de ARs tem ganhado atenção especial. Vantagens associadas à sua utilização podem ser consideradas, tais como a utilização de pressão e temperatura próxima a ambiente; elevada atividade enzimática em condições de pH próximos a neutralidade; controle de produtos, permitindo o aumento dos rendimentos pela ausência de geração de subprodutos tóxicos e a redução de custos em termos de energia e de equipamentos (MENDES, 2004). Segundo Slavov (2017), o pré-tratamento enzimático incrementa em mais de 8% a eficiência de remoção da MO, avaliada em termos de DQO, quando empregada em ARs complexas.

A hidrólise de lipídeos, potencial etapa limitante no processo de biodigestão anaeróbia, se faz necessária devido ao baixo consumo dos triacilgliceróis e AGCL pelas

bactérias fermentativas no lodo anaeróbio (ALVES, 2018). Também são relacionados à necessidade de formação e acúmulo de pequena concentração de H₂ inicial, os quais são formados nas reações de encurtamento da cadeia carbônica dos AGCL (MENDES, 2004). Neste contexto, o H₂ gerado é capaz de afetar o equilíbrio das reações na etapa de acetogênese, que são termodinamicamente desfavoráveis (CHERNICHARO, 2007; METCALF; EDDY, 2016).

Apesar do grande potencial apresentado pelo pré-tratamento biológico, as etapas onerosas como extração e purificação de enzimas, podem representar cerca de 70% do custo total de sua produção, o que, associado sua baixa produtividade, pode inviabilizar a sua utilização em sistemas de tratamento de ARs (FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). Pesquisas desenvolvidas visando alternativas de produção via processos de baixo custo, dispensando etapas onerosas de separação e purificação de enzimas, requeridas em um processo de biocatálise convencional, precisam e devem ser consideradas.

2.5. Fungos filamentosos

Inicialmente considerados como plantas primitivas, os fungos são microrganismos eucariontes, formados por organismos unicelulares ou pluricelulares (mais comum), os quais se alimentam através da absorção direta de nutrientes (MADIGAN et al., 2016; PUTZKE; PUTZKE, 1998). Por não possuírem clorofila, os fungos não são capazes de sintetizar o seu próprio alimento. Sua alimentação se dá heterotroficamente, sendo classificados como saprófitos ou simbióticos (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016).

Quando saprófitos, os fungos vivem sobre a MO, transformando-a em matéria orgânica pela excreção de enzimas extracelulares produzidas pelas hifas, dando início ao processo de digestão. Devido à ação das enzimas extracelulares, os alimentos são dissolvidos no meio e, em seguida, são absorvidos por meio da fina parede da célula, distribuindo-se por difusão simples no protoplasma, passando por todo o organismo do fungo (BRANCO, 2011; MADIGAN et al., 2016). Quando simbióticos, os fungos dependem da ação de outro organismo para sobreviver, podendo ser para benefício mútuo ou apenas para o benefício do fungo parasita (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016; PUTZKE; PUTZKE, 1998).

Os fungos filamentosos são característicos por crescerem em micélios, espécie de tecido próprio dos fungos, constituído pela ramificação ou por alongamento das pontas de finos filamentos celulares, as hifas (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016). No interior das hifas, encontra-se o protoplasma, citoplasma contínuo que pode conter um ou vários núcleos e se move através de um pequeno poro situado no centro de cada septo. As hifas podem ser septadas ou não. As hifas septadas que possuem apenas um núcleo são denominadas monocarióticas, já as que possuem dois núcleos são denominadas dicarióticas. Em relação às hifas não septadas, estas são sempre multinucleadas (STEVENSON, 1994).

Os fungos podem reproduzir-se de forma sexuada ou assexuada (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016). Quando reproduzem assexuadamente, podem fazê-lo através de três modos, a fragmentação do micélio, originando um novo fungo; a gemiparidade, quando se forma uma protuberância com um núcleo ligado à célula-mãe; ou pelo processo de esporulação (MADIGAN et al., 2016). Os esporos são diminutas partículas de protoplasma rodeadas pela parede celular e podem ser originados de dois modos. No primeiro processo, os esporos são formados após a união de dois ou mais núcleos, podendo ocorrer dentro de uma ou de várias células especializadas (ESPÓSITO; AZEVEDO, 2004; MADIGAN et al., 2016). No segundo modo de produção de esporos, é observada a transformação das hifas em numerosos segmentos, sem a união prévia de dois ou mais núcleos (BLACK, 2002; ESPÓSITO; AZEVEDO, 2004). A maioria dos fungos são capazes de produzir esporos sexuais e assexuais.

Desde o início da humanidade, os fungos apresentam significativa importância, uma vez que, juntamente com as bactérias, são os agentes causadores da putrefação e decomposição da MO (MADIGAN et al., 2016). Tal habilidade é atribuída aos dois sistemas enzimáticos extracelulares presentes, o sistema hidrolítico e o sistema oxidativo (SANCHEZ, 2009).

Nas últimas décadas, devido às suas habilidades como a fermentação e síntese de metabólitos (primários e secundários), os fungos vêm sendo cada vez mais utilizados em processos industriais, trazendo inúmeros benefícios, tanto tecnicamente como economicamente. São exemplos de atuação dos fungos em processos industriais a produção de bebidas alcoólicas, produção de fármacos, produção de pães, fabricação de cola líquida, corantes, tintas e a produção de enzimas aplicadas ao tratamento de efluentes.

Sankaran et al. (2010) destacam a utilização de fungos filamentosos para o

tratamento de águas residuárias, concomitante com a produção de bioprodutos de valor agregado. Os autores destacam a potencial utilização de fungos filamentosos para o tratamento da biomassa gerada pelo sistema de lodos ativados, onde são relatadas a síntese média de 0,4 gBiomassa/gDQO afluente removida no sistema aeróbio (METCALF; EDDY, 2016). O processamento e descarte, convencional, do excesso da biomassa aeróbia apresenta de 40 a 60% do custo de operação do sistema de tratamento (CANALES et al, 1994; SANKARAN et al., 2010).

Os sistemas de tratamento compostos por fungos filamentosos apresentam vantagens associadas como o alcance de maiores taxas de degradação de compostos orgânicos complexos, separação eficiente da fração sólida da biomassa fúngica em relação à fração líquida efluente (AR) e a possibilidade de recuperação de bioprodutos fúngicos de valor agregado são descritos na literatura científica (SANKARAN et al., 2010).

A conversão da MO, presente nas ARs, em proteínas fúngicas e bioquímicos de valor agregado, bem como a geração de biomassa fúngica altamente biodegradável, utilizada como fonte de ração animal e, potencialmente, na dieta humana, são relatados nos estudos de Zheng et al. (2005) e Guest e Smith (2002).

Na área de suplementos alimentares, os fungos são, frequentemente, cultivados como fonte de produção e obtenção de uma variedade de substâncias benéficas, tais como os aminoácidos, os álcoois e ácidos orgânicos, as enzimas e outros (VAN LEEUWEN et al., 2003).

2.5.1. Enzimas

As enzimas encontram-se entre os catalisadores mais utilizados na indústria química. As enzimas são moléculas orgânicas, normalmente, de natureza proteica, os quais apresentam atividade metabólica regidas em função de sua estrutura terciária/quaternária, sendo, também, conhecidas como catalisadores biológicos (MADIGAN et al., 2016; NELSON; COX, 2017).

As enzimas são seletivas e atuam sobre as reações químicas acelerando a velocidade em que os processos ocorrem sem alterá-los, agindo na variação de entropia da reação, direcionando o substrato para que ele não colida de forma aleatória, além de diminuir a energia de ativação necessária, sem alterar o equilíbrio desta (BROCK; MADIGAN et al., 1991; NELSON; COX, 2017).

Algumas enzimas requerem a ligação a um outro grupo, ou molécula, para correto funcionamento. Outras não necessitam da adição de nenhuma outra molécula ligada à sua cadeia polipeptídica (SCHMIDELL et al., 2001). Estes grupos, ou moléculas, que se ligam às enzimas são chamados de cofatores ou íons orgânicos, quando são compostos por grupo de moléculas, são chamados de coenzimas (METCALF; EDDY, 2016; NELSON; COX, 2017; SCHMIDELL et al., 2001).

Fatores como alta estabilidade apresentada pelas enzimas entre extremos de pH; elevada atividade; requerimento de temperatura próximas à temperatura ambiente; controle de produtos e subprodutos, devido à especificidade de atuação enzimática; e a não geração de subprodutos tóxicos, são algumas de suas vantagens (AARTHY et al., 2014; ALVES; 2018; CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

De acordo com o tipo de reação química os quais catalisam, as enzimas podem ser classificadas em óxido-redutases, transferases, isomerases, liases, ligases ou em hidrolases, sendo estas últimas representadas pelas lipases (foco deste trabalho), peptidases, amilases, proteases, entre outras (MADIGAN et al., 2016; SCHMIDELL et al., 2001).

2.5.1.1. Lipases

Pertencente a um grupo de enzimas hidrolíticas, as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são responsáveis pela catálise da hidrólise de ligações éster-carboxílicas de acilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol (ARAÚJO et al., 2016; BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016). A Figura 3 apresenta de forma simplificada o processo de hidrólise catalisada pelas lipases.

Figura 3 - Hidrólise de triglicerídeos.



Fonte: Alves (2018).

Quando presentes em meio aquoso ou utilizando-se de solvente orgânico, as lipases clivam as ligações éster de triacilgliceróis. Sob condições micro aquosas, as lipases catalisam a reação reversa, síntese de éster, a partir de um álcool e um ácido carboxílico (MENDES, 2004). Vale ressaltar que a reação de hidrólise é complexa, ocorrendo em vários estágios simultâneos e em diferentes velocidades. Em dado momento da reação, os triglicerídeos presentes no meio reacional são convertidos a diacilgliceróis e monoacilgliceróis, sendo, posteriormente, convertidos a glicerol e ácidos graxos livres (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2013).

As lipases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa com mais de dez átomos de carbonos são chamadas de carboxilesterases, enquanto que as lipases que hidrolisam acilgliceróis com menos de 10 átomos de carbono são chamadas de esterases (AARTHY et al, 2014; CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). Ambas as lipases apresentam diferenças significativas pelas suas especificidades preferenciais. Os lipídeos na forma de triacilgliceróis são os substratos naturais para as carboxilesterases, enquanto que as esterases atuam sobre ligações éster únicas (acilgliceróis), liberando ácidos graxos de baixo peso molecular. Os dois substratos podem ser hidrolisados pelas carboxilesterases, enquanto que o inverso não é verdadeiro (BROCKMAN, 1984).

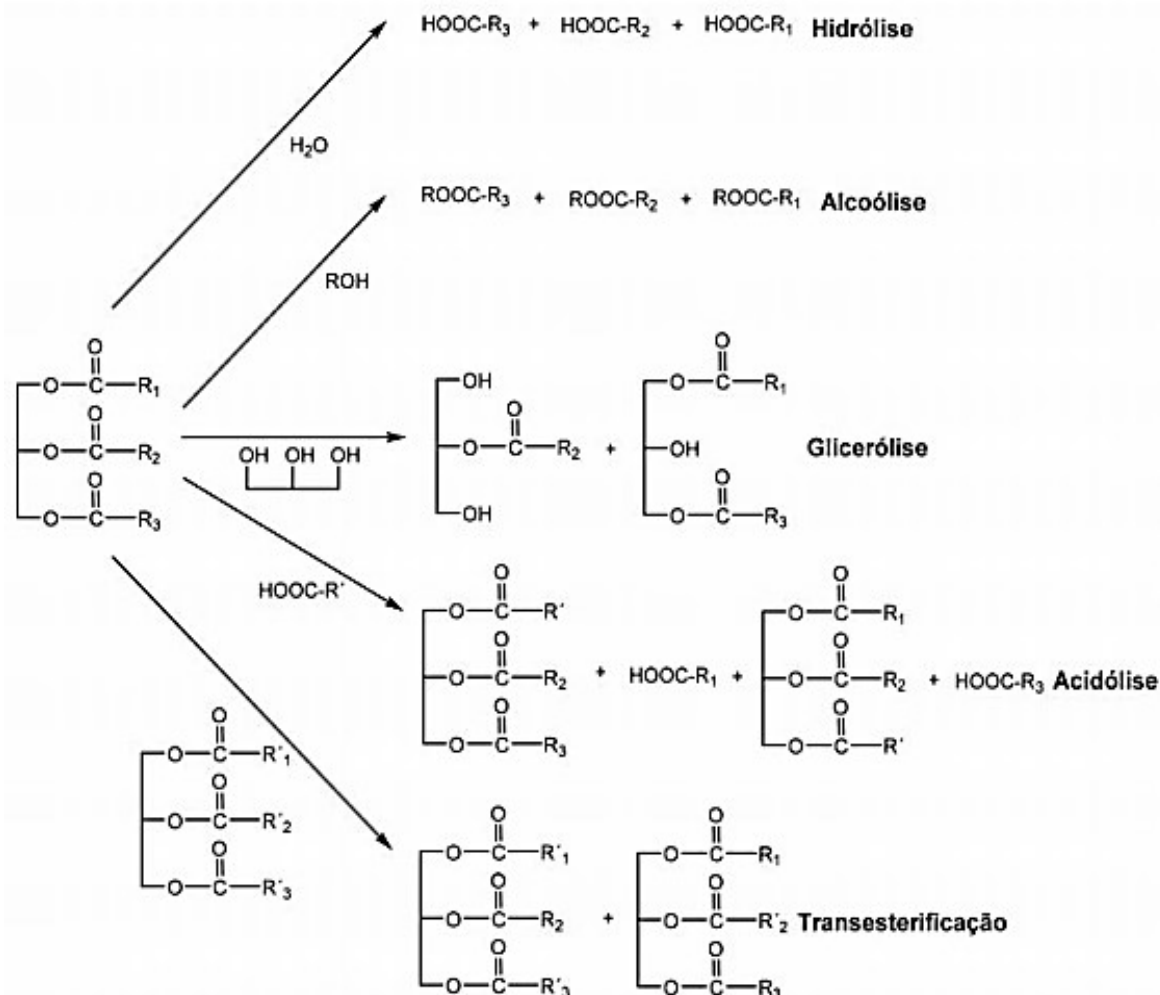
De acordo com o tipo de substrato presente no meio reacional, bem como as condições iniciais de atuação, as lipases podem catalisar uma série de outras diferentes reações (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016), conforme apresentado pela Figura 4.

As enzimas lipolíticas são sintetizadas a partir de diferentes fontes, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana (NELSON; COX, 2017). Segundo estudo realizado por Cortez, De Castro e Andrade (2016), as lipases de origem microbiana se destacam por serem mais puras e estáveis, além de apresentarem propriedades mais diversificadas em comparação com as lipases de origem animal ou vegetal, o que possibilita maior espectro de aplicação. Ainda segundo os autores, fatores como o fácil controle das condições de cultivo e o rápido crescimento celular devem ser considerados, viabilizando possível aplicação dessas enzimas em escala industrial.

Em geral, as lipases apresentam massa molecular variando de 19 a 75 kDa, apresentam boa atividade lipolítica sob condições de pH entre 4 e 9 e em temperaturas de 25°C a 70°C. De acordo com sua origem, estudos apontam atividade enzimática ótima na faixa de temperatura entre 30°C e 40°C, com pH ótimo entre 7,5 e 8,0

(CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). Estabilidade em soluções aquosas a um valor de pH neutro e temperatura ambiente também são observados (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

Figura 4 - Principais reações catalisadas pelas lipases.



Fonte: Cortez, De Castro & Andrade (2016).

Uma vez que as ARs com elevados teores de lipídeos são constituídas, na maioria das vezes, por compostos de difícil degradação (recalcitrantes) e com o crescente reconhecimento da capacidade das enzimas para atuar sobre poluentes específicos, o desenvolvimento do sistema de tratamento de efluentes envolvendo o pré-tratamento enzimático seguido do tratamento biológico anaeróbio pode apresentar inúmeras vantagens (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; MENG et al., 2015).

Merlin Christy, Gopinath e Divya (2014) destacam a simplicidade de aplicação; elevada eficiência quando aplicados em processos que apresentam baixa ou alta

concentração de poluentes e a facilidade no controle do processo, dispensando etapas como a adaptação da biomassa requeridas no processo de DA convencional.

2.5.2. *Produção de células íntegras para o pré-tratamento de efluente com elevado teor de lipídeos*

Atualmente, graças à evolução da bioquímica e genética molecular, enzimas altamente seletivas e estáveis podem ser produzidas. Entretanto, a fim de minimizar os custos com a produção e viabilizar sua aplicação do sistema de tratamento de efluentes, técnicas de produção via métodos de baixo custo e o emprego de técnicas de imobilização celular podem ser consideradas (ALVES et al., 2019; CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

De acordo com os estudos realizados por Lima et al. (2019) e Alves (2018), o cultivo celular do fungo filamentoso *P. citrinum*, utilizando técnica de fermentação submersa e azeite de oliva como fonte indutora de carbono, apresentou significativa produção de enzimas lipolíticas com atividade ligada ao micélio. Segundo Lima et al. (2019), a biomassa fúngica constituída por células íntegras de *P. citrinum* mostrou elevada atividade lipolítica ao final do cultivo celular e mediante ensaios de hidrólise enzimática de óleos vegetais, foram alcançadas porcentagens de hidrólise superiores a 84%. Ainda segundo os autores, as maiores porcentagens de hidrólise enzimática foram observadas em pH 8,0 e temperatura de 45°C.

A utilização de células íntegras de fungos filamentos produtores de lipases, apresenta-se como alternativa de baixo custo. Entretanto, esta requer a utilização de microrganismos produtores de lipases com atividade retida ao micélio, onde as enzimas não são excretadas no meio de cultura líquido ao final do cultivo celular (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). No processo de cultivo celular, as enzimas são aderidas no interior das células em consequência do crescimento celular natural (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016). As condições de operação, bem como as condições físico-químicas utilizadas, afetam significativamente a morfologia de crescimento celular, podendo-se observar diferentes formas. Segundo Papagianni (2004), os fungos filamentosos exibem diferentes formas estruturais ao decorrer de todo seu ciclo de vida e a densidade das hifas apresentam significativa importância para o processo de difusão de oxigênio e nutrientes no interior da biomassa micelial, apresentando efeitos acerca de sua morfologia.

Na técnica de fermentação submersa sob agitação circular, as células íntegras dos fungos filamentosos *P. citrinum* apresentam crescimento característico na forma de “*pellets*”. Os “*pellets*” podem ser considerados como massas esféricas de hifas com estrutura interna variável, compactas e densas (ROMERO; BAIGORI; PERA, 2007). De forma análoga aos suportes utilizados nos processos de imobilização celular, os “*pellets*” agem como matriz celular natural, protegendo as enzimas da ação de agentes externos (ROMERO; BAIGORI; PERA, 2007). Devido à rigidez apresentada pela parede celular dos fungos filamentosos, as células íntegras apresentam elevada resistência mecânica (PAPAGIANNI, 2004).

Visando maior proteção das enzimas contra os agentes externos, bem como o reuso em processos contínuos e descontínuos, a imobilização celular pode se apresentar como técnica interessante. Considerada como um confinamento físico em região delimitada, a imobilização celular é capaz de manter a atividade catalítica celular tanto em processos contínuos como em descontínuos (COVIZZI et al., 2007).

O reaproveitamento do material biológico, em função da utilização de suportes sólidos inertes com alta resistência mecânica; reutilização em processos contínuos e descontínuos e o aumento da estabilidade enzimática são algumas de suas vantagens (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Entretanto, segundo Wang et al. (2005), o rompimento da matriz e limitações difusionais de transferência de massa e oxigênio, afetando a fisiologia e cinética do crescimento celular, devem ser considerados. Em se tratando de AR com elevada concentração de tóxicos e recalcitrantes, os efeitos difusionais associados, em consequência do processo de imobilização celular, podem ser benéficos, expondo os substratos às enzimas de forma gradual, evitando a sua inibição (METCALF; EDDY, 2016).

Devido ao baixo custo, simplicidade de aplicação, fácil manipulação e grande diversidade de suportes existentes, a imobilização celular em suportes inertes é muito utilizada. A escolha da matriz utilizada no processo de imobilização celular depende de suas características físico-químicas, das características do material biológico e das condições de uso do sistema imobilizado, não havendo um método de imobilização e um suporte universal (KILONZO; MARGARITIS; BERGOUGBOU, 2011).

Segundo Covizzi et al. (2007), o tamanho do poro, a porosidade e o grau de hidrofobicidade da matriz interferem, diretamente, na intensidade da adesão celular. Nos processos de imobilização de células de fungos filamentosos, geralmente, são utilizados suportes porosos com elevado tamanho de poro, oferecendo condições ideais para o

acesso aos nutrientes e oxigênio requerido para o crescimento celular. A adesão das células microbianas ocorre na superfície do suporte e, em consequência do crescimento celular, estas penetram no seu interior, preenchendo todo o seu espaço interno.

Devido à grande área superficial, leveza, porosidade uniforme, boa resistência contra os agentes externos e a degradação enzimática, bem como do baixo custo comercial, as espumas de poliuretano (PU) são os suportes inertes mais utilizados, tanto em pesquisas como nos processos industriais (SOARES, 2012).

2.6. Principais desafios para o desenvolvimento do sistema conjugado de tratamento de efluentes

Visto que o processo de DA da AR é conduzido por bactérias e arqueias metanogênicas, sendo a última estritamente anaeróbia (METCALF; EDDY, 2016), e, sabendo-se que, de acordo a literatura, os mofos e bolores são classificados como microrganismos aeróbios estritos (MADIGAN et al., 2016), a presença ou ausência de oxigênio no meio reacional pode se tornar obstáculo para o desenvolvimento do sistema de tratamento de AR conjugado.

Em estudo realizado por Kuracov et al. (2011), sob condições anaeróbias, foram verificadas a habilidade de crescimento celular e a capacidade de fermentação alcoólica envolvendo 344 cepas de microfungos (*micromycetes*), representando mais de 60 espécies. Ainda segundo os autores, as cepas de espécies de *P. citrinum* não foram capazes de apresentar crescimento sob as condições impostas.

Devido ao seu potencial, alguns estudos estão avaliando os efeitos da interação entre os fungos e bactérias, como o estudo realizado por Schroeckh et al. (2009). Segundo os autores, a interação simbiótica entre fungos e bactérias promoveram a ativação de um metabólito secundário específico do fungo que não é observado quando está isolado. Entretanto, em se tratando do processo de digestão anaeróbia, a possível produção de metabólitos secundários, pelos fungos, pode se tornar fator inibitório para as bactérias e arqueias metanogênicas.

Avella et al. (2014) estudaram os efeitos da associação entre fungos e bactérias, visando a melhora da sedimentação de lodos, visto que os fungos, assim como as bactérias, produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS), agregando as partículas de sólidos suspensos voláteis (SSVs) e promovendo aumento do diâmetro

destas partículas. Segundo os autores, a associação fúngica com bactérias resultou em melhora da sedimentação, com redução da concentração de sólidos sedimentáveis no efluente de 800 – 1000 mL/L para 200 mL/L, além do aumento do tamanho médio dos flocos de 50%, após 20 dias de tratamento. Ainda segundo os autores, as eficiências de remoção de DQO, tanto para a condição aeróbia como para a condição anóxica, foram em média de 86 a 95%. Não foram avaliados os efeitos separados da atuação de fungos e de bactérias na sedimentação do lodo.

O emprego de células íntegras lipolíticas de *Yarrowia lipolytica*, como parte integrante do sistema de lodos ativados para o tratamento de AR com alto teor de lipídeos, foram estudados por Song et al. (2011). Segundo os autores, foi relatado que para 72 horas de tratamento, houve uma eficiência de remoção de DQO de 97,6% e remoção de O&G de 96,9%, contra 67,5% de remoção de DQO e 45,1% de remoção de O&G sem a presença de células íntegras no sistema de lodos ativados.

O emprego de fungos em sistemas de tratamento de ARs está associado à manutenção de sua atuação em condições próximas às condições de operação dos reatores biológicos. Requerimento de condições ambientais ou condições operacionais extremas, das praticadas pelo processo anaeróbio, podem inviabilizar a sua utilização, uma vez que custos adicionais para ajustes de tais condições devem ser considerados.

Em função da revisão de literatura supracitada, faz-se necessário o desenvolvimento de processos alternativos que objetivam auxiliar a aplicação de processos biológicos convencionais para tratamento de ARs complexas, como o apresentado pelos efluentes da indústria de produtos lácteos. O potencial de aplicação de células íntegras na hidrólise enzimática, obtidas em processos de baixo custo, torna-se técnica economicamente atraente, uma vez que essas células apresentam elevado potencial de conversão de lipídeos em ácidos orgânicos, embora ainda seja pouco explorado em sistemas de tratamento de ARs.

3. PREMISSAS E HIPÓTESES

O presente trabalho foi subsidiado a partir das lacunas de conhecimento identificados na literatura pertinente, o qual, foi base para o estabelecimento das premissas e hipóteses para investigação que se seguem.

3.1. Premissas

Foram considerados 4 cenários principais de investigação, tratados a seguir:

3.1.1. *Cenário 1 – Adaptação de metodologia para análise de lipídeos e suas frações na AR da indústria de laticínio*

- (i) Os lipídeos presentes nas ARs da indústria de laticínios representam menos que 2% m/m, inviabilizando o emprego de técnicas analíticas convencionais para determinação de lipídeos que demandam significativas concentrações destes em relação ao volume de amostra a ser analisado.
- (ii) Em reatores acidogênicos contínuos, o acompanhamento do processo hidrolítico, pela biomassa produzida é dificultado, função da variação de concentração dos organismos presentes e de sua atividade. Uma vez que a biomassa pode sair na corrente efluente, além de crescer no interior dos reatores, a determinação da quantidade de biomassa fúngica ativa e atuante na síntese de enzimas, após processo de inoculação, torna-se um entrave.
- (iii) A conversão das frações de lipídeos, analisada pelo método cromatográfico, juntamente com análises de glicerol, teor de acidez do meio e a determinação da constante de desativação enzimática, apresentam-se como parâmetros de monitoramento do processo hidrolítico.

3.1.2. *Cenário 2 - Obtenção de enzimas ativas e estáveis via processos de baixo custo*

- (i) O caráter inovador da aplicação de enzimas hidrolíticas como parte do tratamento de ARs complexas vem sendo estudado por diversos pesquisadores. O potencial de pré-tratamento para aumento da remoção de MO e produção de metano mostram resultados interessantes, porém,

processos de obtenção de enzimas de baixo custo devem ser considerados.

- (ii) O cultivo de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, via técnica de fermentação submersa, não requer as onerosas etapas de extração e purificação de enzimas, visando o pré-tratamento da AR de laticínio.
- (iii) Os “*pellets*” formados pelos fungos filamentosos de *P. citrinum* se apresentam como material de proteção contra agentes externos e agentes ambientais.

3.1.3. Cenário 3 – Desenvolvimento de atividade fermentativa das células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* em sistema anaeróbio e microaerado

- (i) Durante o crescimento celular, os esporos inoculados do fungo filamentoso *P. citrinum* sintetizam as enzimas necessárias para a assimilação dos nutrientes do meio, possibilitando o crescimento celular na forma de “*pellets*”. A reposição do ferramental enzimático, posterior crescimento celular não é conhecida. Nesse sentido, a exploração da produção e/ou manutenção enzimática em reatores biológicos, para o pré-tratamento de AR, pode trazer benefícios ao processo de tratamento convencional.
- (ii) Segundo a literatura fundamental, os fungos filamentosos fazem parte da classe dos microrganismos aeróbios estritos. No entanto, estudos demonstram a capacidade de atividade fermentativa para diversos gêneros e espécies de fungos filamentosos na ausência de oxigênio molecular.
- (iii) Visando a utilização dos fungos filamentosos de *P. citrinum* como parte do sistema de tratamento de efluentes, composto por reator de hidrólise seguido de reator metanogênico, a capacidade fermentativa em anaerobiose se mostra viável, reduzindo-se, assim, possíveis gastos com aeração do meio nos sistemas de tratamento.

3.1.4. Cenário 4 – Realização do pré-tratamento enzimático seguido da digestão anaeróbia do efluente da indústria de laticínio para a remoção da matéria orgânica e geração de metano

- (i) O potencial de pré-tratamento da água residuária com elevado teor de gorduras, utilizando células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, em

reatores contínuos é um campo ainda inexplorado.

- (ii) A aplicação do tratamento conjugado (hidrolítico e anaeróbio) pode trazer benefícios ao processo de tratamento biológico convencional, tanto em termos do aumento da produção de metano, como em termos do aumento da capacidade de tratamento, dado pela redução do tempo de detenção hidráulico.

3.2. Hipóteses para investigação

Hipótese 1

A determinação da constante de desativação enzimática, juntamente com análises do teor de glicerol, acidez total e avaliação qualitativa das frações de lipídeos do meio líquido, via cromatografia gasosa (*GC-FID*), se mostram como parâmetros eficazes para avaliação e monitoramento do processo hidrolítico.

Hipótese 2

O ferramental enzimático hidrolítico, inicialmente sintetizado durante a etapa de crescimento celular, pela biomassa fúngica de *P. citrinum*, é recomposto no interior dos reatores contínuos durante a biotransformação da MO.

Hipótese 3

Os fungos filamentosos de *Penicillium citrinum* são capazes de realizar a fermentação ácida da AR de produtos lácteos mediante a ausência de oxigênio molecular.

Hipótese 4

A realização do pré-tratamento enzimático de efluentes de laticínios possibilita o aumento da eficiência de biodegradação anaeróbia, proporcionando o aumento da remoção de MO e produção de metano, em reatores biológicos.

4. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da aplicação de hidrólise enzimática, utilizando células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*, como etapa de pré-tratamento, em reator contínuo estruturado de fluxo ascendente, associando-o ao processo anaeróbio convencional, para o tratamento de efluente de laticínio contendo elevados teores de gorduras.

4.1. Objetivos Específicos

Os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Adaptar metodologia para auxílio na avaliação e monitoramento do processo hidrolítico da AR de laticínio utilizando biomassa fúngica composta de células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*;
- Cultivar células íntegras, livres e imobilizadas, do fungo filamentoso *P. citrinum*, para a produção de biocatalisadores ativos e estáveis;
- Realizar ensaios, em batelada, para a determinação da influência da concentração de lipídeos sobre os parâmetros cinéticos da constante de desativação enzimática e tempo de meia vida das lipases produzidas pelas células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*;
- Realizar ensaios, em batelada, para a determinação dos perfis metabólicos (remoção de DQO, proteínas, carboidratos, glicerol e acidez total) das células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* e do lodo anaeróbio granular na biodegradação anaeróbia da AR de laticínio;
- Realizar ensaios, em batelada, para a avaliação dos efeitos da ausência de oxigênio molecular na hidrólise enzimática da AR de laticínio com células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*;
- Avaliar os efeitos da microaeração, imobilização enzimática e emprego de diferentes concentrações de células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*, em reatores contínuos de fluxo ascendente, para o pré-tratamento biológico da AR de laticínio;
- Adaptar o lodo anaeróbio granular para a realização da DA do efluente de laticínio, em reator contínuo de leito estruturado, avaliando-se os efeitos da carga

orgânica volumétrica afluyente aplicada ao reator e da redução de alcalinidade adicionada ao meio líquido para a produção de metano e remoção da MO;

- Utilizar sistema conjugado de reatores contínuos, empregando de forma sequencial a hidrólise enzimática, com células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum*, e o processo de DA convencional, utilizando-se as melhores condições de operação obtidas em etapas anteriores;
- Avaliar o comportamento hidrodinâmico e caracterização da comunidade microbiana dos reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos, o último em períodos anterior e posterior ao pré-tratamento enzimático com células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum*.

5. METODOLOGIA

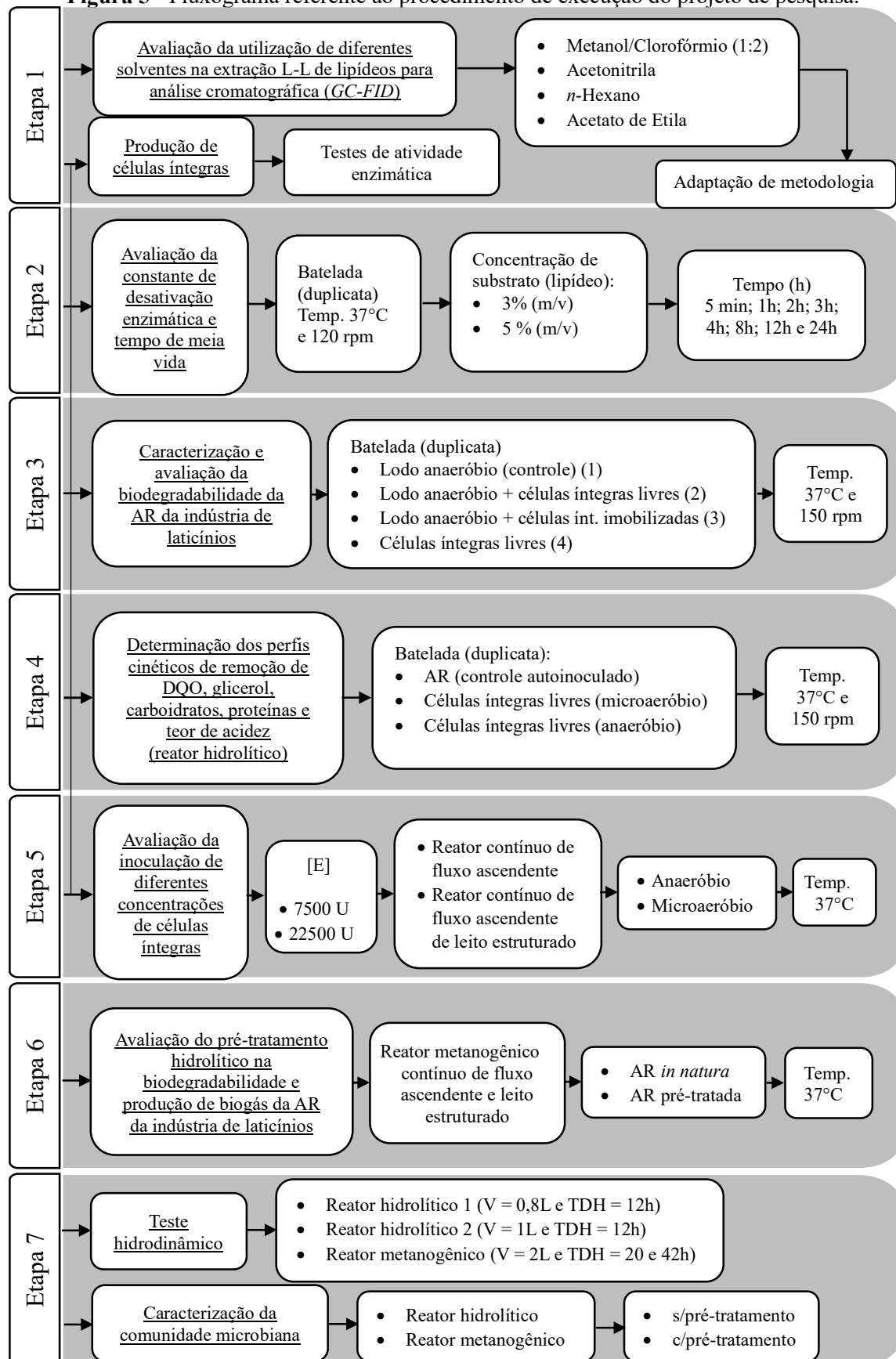
5.1. Fluxograma experimental

O desenvolvimento do presente projeto foi dividido em 7 etapas:

- Etapa 1 - Avaliação da utilização de diferentes solventes orgânicos na extração líquido-líquido para análise de lipídeos; adaptação de metodologia para análise de lipídeos via cromatografia gasosa *GC-FID*; produção de células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum* e realização de testes de atividade enzimática;
- Etapa 2 – Realização de estudos cinéticos sobre a avaliação da constante de desativação enzimática (k_d) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$), das enzimas produzidas mediante cultivo celular, atuando sob diferentes concentrações de substratos lipídicos (3% e 5% m/v);
- Etapa 3 - Caracterização e avaliação da biodegradabilidade da AR da indústria de laticínio, em reatores em bateladas, utilizando lodo anaeróbio (1); lodo anaeróbio concomitantemente com células íntegras livres (2), lodo anaeróbio e células íntegras imobilizadas (3) e células íntegras livres (4), sendo estes precursores para estimativa das condições operacionais dos reatores contínuos.
- Etapa 4 - Caracterização e avaliação da hidrólise enzimática da AR de laticínio, em reatores em bateladas, utilizando células íntegras livres em condições anaeróbias e microaeróbias para a determinação dos perfis cinéticos de remoção de DQO, glicerol, carboidratos, proteínas e teor de acidez.
- Etapa 5 - Avaliação da imobilização celular e inoculação de diferentes concentrações de células íntegras [7500 e 22500 unidades enzimáticas (U)], em reator contínuo de fluxo ascendente, sob anaerobiose (topo fechado para a atmosfera) e microaeração (topo aberto);
- Etapa 6 - Avaliação dos efeitos do pré-tratamento biológico com células íntegras, em reatores contínuos, na biodegradabilidade e produção de biogás da AR da indústria de laticínio, em reator contínuo metanogênico de leito estruturado;
- Etapa 7 - Avaliação hidrodinâmica e caracterização da comunidade microbiana, via sequenciamento metagenômico, dos reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos, nas condições de operação utilizadas.

De forma simplificada, a Figura 5 apresenta o fluxograma de execução do projeto.

Figura 5 - Fluxograma referente ao procedimento de execução do projeto de pesquisa.



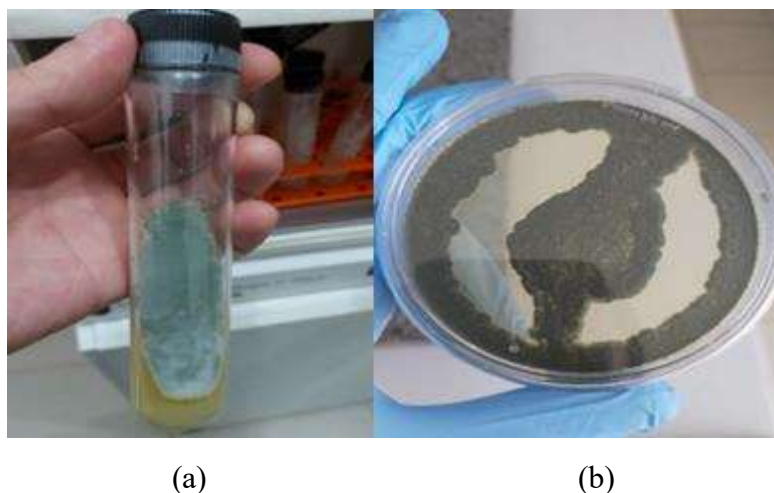
5.2. Material

5.2.1. Biomassa fúngica

Para a produção das células íntegras, foi utilizado o fungo filamentososo *Penicillium citrinum* F53, extraído e isolado a partir de uma alga *Caulerpa sp.* pela Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e adquirido junto ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQSC/USP), conservado em temperatura de 3 a 5°C e em meio sólido batata dextrose ágar (PDA) (*Difco*[®]).

A Figura 6 apresenta o fungo filamentososo *Penicillium citrinum*, crescido em meio sólido PDA, utilizado como fonte de esporos para a produção das células íntegras.

Figura 6 - *P. citrinum* em (a) tubo de ensaio com tampa roscável e em (b) placa de petri. Ambos crescidos em meio sólido PDA.



5.2.2. Meio de cultura

O meio de cultura líquido para a produção das células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum* foi composto por fonte de carbono 30 g/L (óleo de oliva comercial *Carbonell*[®]), fonte de nitrogênio 70 g/L (peptona de soja *Himedia*[®]), nitrato de sódio (NaNO_3) 1 g/L (*Synth*[®]), fosfato de potássio (KH_2PO_4) 1 g/L (*Synth*[®]) e sulfato de magnésio hepta hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,5 g/L (*Synth*[®]) (LIMA et al., 2019). O

meio de cultura foi devidamente autoclavado a 121°C, por período de 20 minutos (APHA, 2012).

A Figura 7 mostra o meio de cultura líquido sintético utilizado para a produção de células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* livres e imobilizadas em espumas PU.

Figura 7 - Meio de cultura líquido sintético (esquerda) e meio de cultura líquido sintético com espumas PU (direita).



5.2.3. Fonte de substrato

Água residuária da indústria Laticínio Hopelat, localizada no município de Santa Cruz da Esperança - SP, Brasil, foi coletada e armazenada em galões de plástico polipropileno, à temperatura de -20°C, afim de alimentar os reatores hidrolíticos e metanogênicos, preservando-se as suas características físico-químicas.

5.2.4. Lodo Anaeróbio

Para a inoculação da etapa de metanogênese, foi utilizado o lodo mesofílico granular anaeróbio da Avícola Céu Azul, sediada no município de Pereiras - SP, conservado sob temperatura de 4°C. A inoculação do reator metanogênico seguiu a metodologia descrita por Zaiat et al. (1994).

5.2.5. Suporte de imobilização

Espumas de poliuretano (PU), previamente tratadas em solução ácido nítrico (HNO_3) 0,1 mol/L por 2 horas e lavadas em água até o pH neutro, foram utilizadas como suporte de imobilização das células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* e do lodo anaeróbio granular.

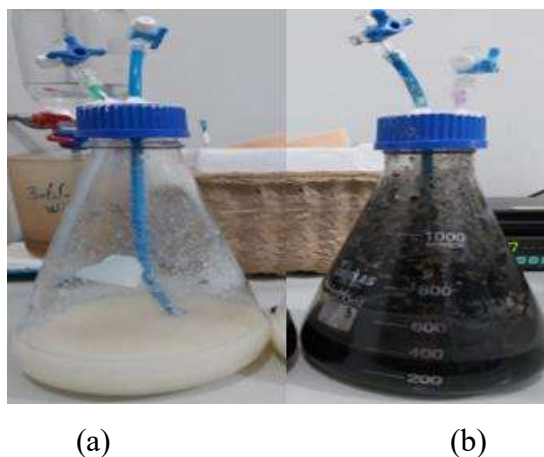
Nos ensaios em batelada, para a imobilização celular, foram utilizados cubos de 0,6 cm de arestas de espumas PU. Nos ensaios contínuos, foram utilizadas tiras de espumas PU, com comprimento variando de acordo com o volume útil do reator utilizado e espessura de 1 cm.

5.2.6. Reatores

As Etapas 2, 3 e 4 de execução do presente trabalho foram conduzidas em reatores operados em batelada. Na Etapa 2, os reatores utilizados apresentavam volume útil de 250 mL. Já nas Etapas 3 e 4, os reatores utilizados possuíam volume útil de 1000 mL. Para favorecer a condição de anaerobiose, após a alimentação dos reatores, os frascos foram fluxionados com mistura gasosa composta por nitrogênio (N_2) (70%) e CO_2 (30%), por período de 10 minutos. Os reatores foram, então, fechados hermeticamente com sistema composto por tampa de plástico roscável, tampa de butila e silicone. Acoplado à tampa, foi colocado um sistema de captação do biogás, a fim de realizar a análise de sua composição e quantificação, e um sistema para a coleta do meio reacional líquido, conforme evidenciado pela Figura 8.

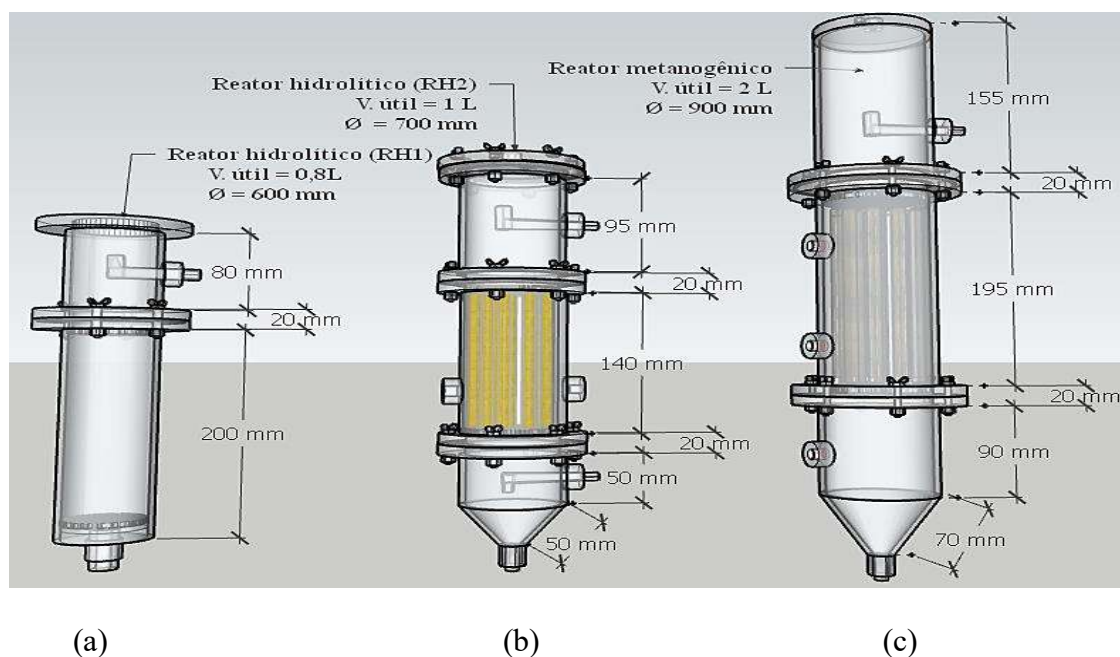
A quantificação do biogás gerado nos ensaios em batelada foi realizada pela leitura da pressão do interior dos frascos, utilizando-se um transdutor de pressão *BS – 2200*.

Figura 8 - (a) Frasco reator para hidrólise enzimática da água residuária da indústria de laticínio utilizando células íntegras lipolíticas do fungo filamentososo *P. citrinum* e (b) frasco reator com água residuária e lodo anaeróbico para avaliação da digestão anaeróbia.



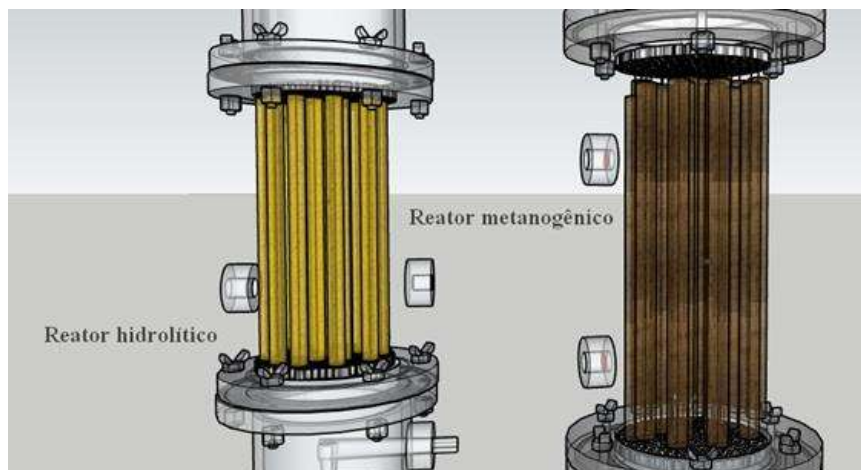
As Etapas 5, 6 e 7 foram conduzidas em reatores contínuos de fluxo ascendente. Os reatores hidrolíticos/acidogênicos, RH1 e RH2, apresentavam volumes úteis de 0,8 e 1 litro, respectivamente. O reator anaeróbico de leito estruturado (AnSTBR) (reator metanogênico) apresentava volume útil de 2 litros. O reator AnSTBR1 foi alimentado com AR bruta e o reator AnSTBR2 foi alimentado com AR pré-tratada. A Figura 9 detalha a configuração dos reatores contínuos utilizados no presente trabalho.

Figura 9 - Configuração mecânica do reator contínuo (a) hidrolítico com fungos livres (*pellets*), (b) hidrolítico de leito estruturado (biomassa fúngica imobilizada) e (c) metanogênico de leito estruturado (biomassa anaeróbia imobilizada).



Nos ensaios que requeriam a presença de leito estruturado para a imobilização dos microrganismos e, conseqüentemente, aumento do tempo de retenção celular (TRC) no interior dos reatores, foram utilizados sistemas contendo grades metálicas, fios de arame e tiras de espumas PU, conforme apresenta a Figura 10.

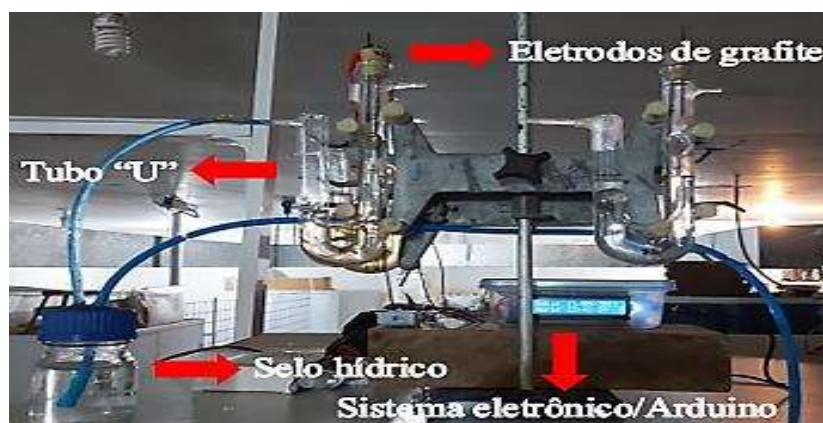
Figura 10 - Leito estruturado dos reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos.



Após a alimentação dos reatores contínuos com AR de laticínio e de forma análoga ao processo em batelada, a condição de anaeróbiose para a operação dos reatores contínuos foi favorecida pelo fluxonamento com mistura gasosa de N_2/CO_2 (70/30%), por 10 minutos, mantido os reatores com pressão positiva na cabeça (*headspace*). Os reatores foram, então, alocados em câmara incubadora para BOD (*ethik* 411-TD), na temperatura de 37°C.

Acoplado à parte superior dos reatores, foi conectado um sistema de quantificação de biogás, previamente calibrado. O sistema de quantificação foi composto por mangueira de silicone, tubo em “U”, tampa de silicone, solução salina 50%, grafite e sistema eletrônico com placa de Arduino. A Figura 11 apresenta o sistema de quantificação do biogás utilizado nos ensaios contínuos.

Figura 11 - Sistema de quantificação do biogás gerado durante a biodegradação anaeróbia da AR da indústria de laticínio em reator contínuo.



5.3. Metodologia experimental

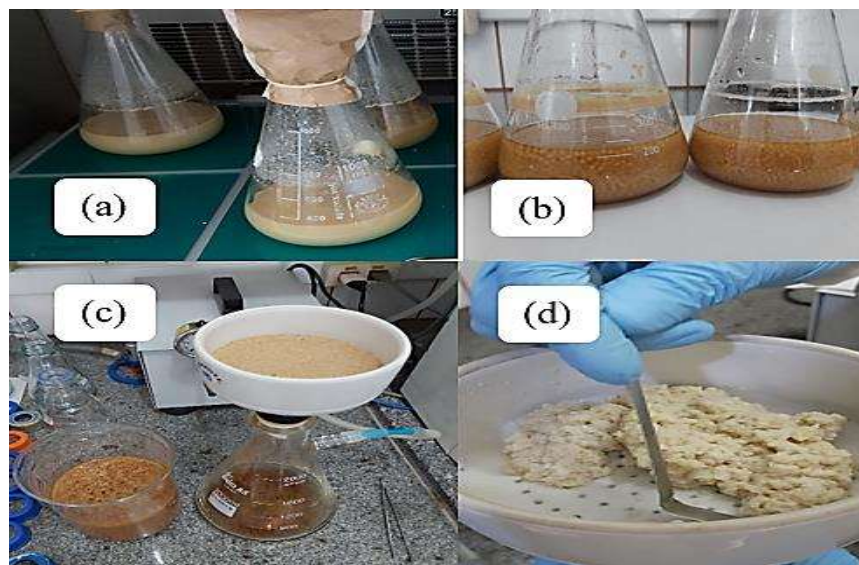
5.3.1. Preparação e imobilização das células íntegras

O preparo e imobilização das células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum* foram realizados conforme metodologia modificada descrita por Andrade et al. (2012). O preparo das células íntegras livres foi conduzido em Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 345 mL de meio de cultura líquido e suspensão de 1×10^7 esporos do fungo em água estéril. Os esporos foram colhidos pela adição de 10 mL de solução esterilizada de Tween 80 (0,05% v/v) e sua concentração foi determinada em câmara de Neubauer. Os erlenmeyers foram colocados em incubadora orbital *Shaker (Inforns HT Multitron Pro)*, à temperatura de 30°C e 170 rpm, por período máximo de 96h.

O preparo das células íntegras imobilizadas, utilizadas nos ensaios em batelada, seguiu o mesmo procedimento do preparo de células íntegras livres, porém, ao meio de cultura foram adicionados 0,6 g de cubos de espuma PU (Figura 7). Em ambos os processos, a biomassa obtida, livre ou imobilizada, foi separada do meio de cultura mediante filtração a vácuo e lavada com água destilada.

A Figura 12 apresenta a produção de células íntegras livres aptas a serem inoculadas nos reatores em batelada e nos reatores contínuos.

Figura 12 - (a) Cultivo de células íntegras imobilizadas com meio de cultura contaminado por bactérias; (b) cultivo de células íntegras livres sem contaminação; (c) filtração a vácuo das células íntegras cultivadas e (d) células íntegras livres (biomassa fúngica).



5.3.2. Determinação da atividade enzimática das células íntegras

A atividade enzimática (lipolítica) das células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* foi quantificada conforme metodologia modificada apresentada por Andrade et al. (2014). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva, 90 mL de água destilada e goma arábica a 3% (m/v). Em frascos *Erlenmeyer*[®] de 125 mL, foram adicionados 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) e 1 g de células íntegras (massa úmida).

Os frascos foram incubados à temperatura de 37°C, por período de 5 minutos, em banho termostático e com agitação a 120 rpm. Posteriormente, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de mistura de etanol e água destilada (1:1). O meio reacional foi titulado com solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados conforme mostra a Equação 3.

$$\text{Atividade enzimática (U/g)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M_{KOH} \cdot 10^3}{t \cdot m_{seca}} \quad \text{Equação 3}$$

em que V_a representa o volume de titulante gasto na titulação da amostra (mL), V_b representa o volume de titulante gasto na titulação do branco (mL), M_{KOH} representa a molaridade do titulante utilizado (mol/L), t representa o tempo de reação (min) e m_{seca} a quantidade de massa seca de biocatalisador utilizada durante a reação (g). Uma

unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades enzimáticas foram expressas em μ mol/g.min (U/g) (ANDRADE et al., 2012).

5.3.3. Extração líquido-líquido de lipídeos utilizando diferentes solventes para avaliação qualitativa via cromatografia gasosa (GC-FID)

Para determinação qualitativa das frações de lipídeos presentes na AR da indústria de laticínios, via cromatografia gasosa (GC-FID), previamente e posteriormente ao pré-tratamento enzimático, foram avaliadas a influência da utilização de diferentes solventes orgânicos na etapa de extração por partição líquido-líquido (L-L). A extração líquido-líquido, ou extração por solvente, foi realizada em funil de separação de 125 mL e os solventes orgânicos avaliados foram o Acetato de Etila (AcOEt) (Synth[®]), a mistura Clorofórmio (Quemis[®]) e Metanol (Synth[®]) (1:2), o *n*-Hexano (Synth[®]) e a Acetonitrila (Synth[®]).

A Tabela 7 apresenta os volumes dos diferentes tipos de solventes orgânicos utilizados para a extração dos lipídeos em volume de 10 mL de amostra (AR).

Tabela 7 - Solventes avaliados na etapa de extração líquido-líquido de lipídeos.

Tipo de solvente	Volume (mL)	Referência
Acetato de Etila	50	Pedersen-Bjergaard, Rasmussen e Grønhaug Halvorsen (2000)
Acetonitrila	30	Birolli, Da Silva e Rodrigues-Filho (2020)
Clorofórmio/Metanol (1:2)	11,2/22,4	Bligh e Dyer (1959)
<i>n</i> -Hexano	50	Xia, Whigan e Jemal (1999)

Posteriormente à separação e extração, a fase orgânica de interesse (extrato) foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e concentrada em rotaevaporador, à temperatura de 30°C e rotação de 80 rpm. Em torno de 2 mL do extrato concentrado foram transferidos para um Eppendorf[®] de 3 mL, adicionando-se 0,3 g de sulfato de sódio anidro (agente secante, Synth[®]) para a remoção de resquícios de água. Foi realizada a filtração a vácuo das amostras para a obtenção do extrato contendo lipídeos aptos a serem analisados via GC-FID.

5.3.3.1. Análise das frações de lipídeos via cromatografia gasosa GC-FID

Os lipídeos extraídos, por extração líquido-líquido em diferentes solventes orgânicos, foram analisados em cromatógrafo a gás (*Shimadzu*[®]), modelo *GC-2010*, com auto injetor modelo *AOC-29i*, detector *FID* e coluna cromatográfica *BD-EN14103* (30m x 0,320mm x 0,25 μ m) (*Agilent*[®]).

O método cromatográfico para a determinação qualitativa das frações de lipídeos, presentes na AR, anterior e posterior tratamento com células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum*, seguiu as seguintes condições: N₂ como gás de arraste, razão de *split* 1:20, volume de injeção de 1 μ L, temperatura do injetor de 270°C e do detector de 350°C. A temperatura inicial da coluna cromatográfica foi de 100°C, o qual permaneceu por 1 minuto, com posterior taxa de aquecimento de 15°C/mim até a temperatura de 180°C. Posteriormente, a taxa de aquecimento foi de 7°C/mim até atingir a temperatura de 225°C e de 30°C/mim até atingir a temperatura de 350°C, permanecendo nessa temperatura por período de 5 mim.

Os tempos de retenção foram expressos em minutos e o melhor método foi estabelecido.

5.3.4. Reação de hidrólise da água residuária da indústria de laticínio contendo lipídeos por catálise básica

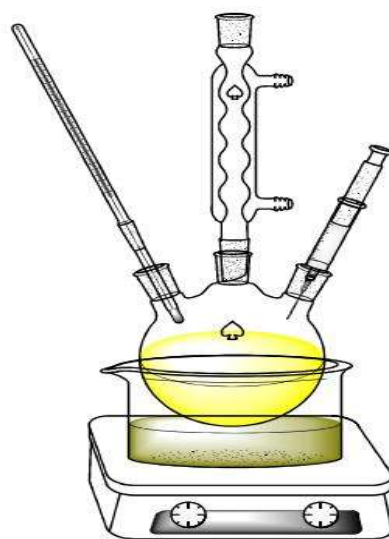
Como método de avaliação do processo de tratamento hidrolítico com as células íntegras do fungo *P. citrinum*, a hidrólise da AR da indústria de laticínios, via catálise básica, foi utilizada como padrão para a determinação das frações de lipídeos presentes no efluente de laticínios, mediante determinação cromatográfica via *GC-FID*. Outros padrões utilizados foram o óleo de soja comercial (*Liza*[®]), o azeite de oliva extra virgem (*Carbonell*[®]) e a AR da indústria de laticínios *in natura*.

A hidrólise da AR via catálise básica seguiu o procedimento descrito por Freedman, Butterfield e Pryde (1986), com modificações. Em um balão volumétrico de três bocas de 250 mL foram introduzidos 50 mL de AR da indústria de laticínios. O balão volumétrico foi equipado com um condensador de refluxo e um termômetro graduado para o controle de temperatura do sistema. O aparato experimental foi montado sobre um agitador magnético com aquecimento, em banho de óleo de silicone,

permanecendo sob agitação moderada até atingir a temperatura de 70°C.

Paralelamente, ao sistema foram adicionados hidróxido de sódio (NaOH) de forma gradual, diluído em 25 mL de metanol, por meio de uma seringa. O NaOH adicionado seguiu a proporção de 1% (m/m) com relação ao teor de lipídeo presente na AR, estimado este em torno de 2% (m/m). A Figura 13 representa o aparato experimental utilizado para a hidrólise básica da AR de laticínio.

Figura 13 - Aparatado experimental para a realização da hidrólise básica da AR de laticínio como padrão para o monitoramento da hidrólise enzimática em reatores contínuos.



Fonte: Rosset (2011).

A mistura reacional permaneceu sob agitação moderada e temperatura de 70°C, por período de 30 minutos. Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação de fases, permanecendo por 24 horas. A fase inferior (glicerol) foi descartada e a fase superior foi lavada com solução 10% (v/v) de ácido clorídrico (HCl) (3 x 50 mL) e concentrada em rotaevaporador.

O resíduo de água foi removido por adição de pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e sendo em seguida realizada uma filtração simples. O produto, então, foi utilizado como padrão da análise de frações de lipídeos da AR da indústria de laticínios, via *GC-FID*.

5.3.5. Metil esterificação de ácidos graxos com solução de diazometano

O processo de metilação dos ácidos graxos foi realizado conforme descrito por Ikeda et al. (1982). A reação de metil esterificação (metilação) dos ácidos graxos presentes nas amostras de lipídeos foram conduzidas em capela. Para tanto, para cada 1 mL de amostra contendo os lipídeos e suas frações, foram utilizados 1 mL de solução de diazometano. Em balão volumétrico de 5 mL, a reação permaneceu por período de 15 minutos. Posteriormente, o excesso de diazometano (coloração amarela) foi evaporado por meio da lavagem do meio reacional utilizando-se um gás inerte (argônio ou nitrogênio).

5.3.6. Determinação da constante de desativação enzimática e tempo de meia vida das lipases produzidas via cultivo celular

Na Etapa 2, os ensaios em batelada foram conduzidos em frascos *Erlenmeyers*[®] de 125 mL, acrescidos de 5 mL de emulsão de substrato ou AR da indústria de laticínio Hopelat, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) e 1 g de biomassa fúngica (base úmida). O teor de lipídeos presentes na emulsão utilizada foi de 5,2 e 3% (m/v), representado este pela adição de azeite de oliva *Carbonell*[®], com demais constituintes como a água destilada e goma arábica 3% (m/v).

Os frascos foram incubados em *Shaker (Inforns HT Multitron Pro)* com agitação orbital sob 37°C, em 120 rpm, por períodos de 5 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 8h, 12h e 24h. Ao final dos tempos pré-estabelecidos, foi realizada a titulação das amostras para a determinação da atividade hidrolítica das células íntegras. Para cada condição avaliada, tanto em termos de concentração de lipídeos presentes na emulsão ou pela utilização da própria AR da indústria de laticínio, foram realizadas duplicatas para cada tempo avaliado, representando um total de 16 bateladas por ensaio.

O modelo de Michaelis-Menten pressupõe que o substrato S e a enzima E combinam-se para formar um complexo enzimático ES, o qual se dissocia, posteriormente e irreversivelmente, no produto P e na enzima não combinada E regenerada. A formação do complexo ES é rápida, sendo a etapa de dissociação do complexo ES em P caracterizado como etapa limitante da velocidade global da reação (BAILEY; OLLIS, 1986; LEVENSPIEL, 1999). A desativação enzimática é um processo reversível enquanto a degradação da enzima, perda de sua atividade catalítica,

é irreversível (LEVENSPIEL, 1999). O modelo de degradação enzimática de primeira ordem, representa de forma simplificada tal processo, conforme mostra a Equação 4 (FOGLER 1999; LEVENSPIEL, 1999).

$$V_d = k_d \cdot [E] \quad \text{Equação 4}$$

nessa expressão, V_d é a velocidade de degradação da enzima; k_d é a constante de desativação e $[E]$ é a concentração de enzima ativa no sistema.

Neste contexto, não havendo a reposição das enzimas sintetizadas no meio, a concentração de enzima ativa tende a decrescer ao longo do tempo de forma exponencial (BAILEY; OLLIS, 1986), como:

$$[E] = [E_0] \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad \text{Equação 5}$$

onde $[E_0]$ é a concentração inicial de enzima ativa no sistema e “ t ” é o tempo.

Considerando-se que a hidrólise dos lipídeos, presentes na AR da indústria de laticínio, ocorre de forma irreversível quando a reação é conduzida em meio aquoso e em excesso, a constante de desativação enzimática (k_d) pode ser calculada em função das velocidades e tempo de reação, conforme Eq. 6 (LEVENSPIEL, 1999).

$$\ln \frac{V_{m\acute{a}x}}{V_{m\acute{a}x,0}} = -k_d \cdot t \quad \text{Equação 6}$$

$V_{m\acute{a}x}$ refere-se à velocidade máxima de reação, medida para determinado tempo “ t ”, e $V_{m\acute{a}x,0}$ como sendo a velocidade inicial máxima de reação para “ t ” igual a zero.

Segundo SCHMIDELL et al. (2001), o tempo de meia vida enzimático representa o tempo necessário para que as enzimas percam 50% de sua atividade inicial. A constante de desativação enzimática (k_d) pode se relacionar com o tempo de meia vida enzimático por meio da Equação 7 (LEVENSPIEL, 1999; SCHMIDELL et al., 2001).

$$t_{1/2} = \frac{\ln .5}{k_d} \quad \text{Equação 7}$$

em que $t_{1/2}$ refere-se ao tempo de meia vida enzimático (h).

5.3.7. Avaliação da biodegradabilidade da água residuária da indústria de laticínio em reatores batelada

As Etapas 3 e 4 foram conduzidas com AR de laticínio como substrato, mediante ensaios em batelada, em câmara com agitação orbital (*Shaker - Inforns HT Multitron Pro*), a 150 rpm, 37°C e em duplicata. O ajuste do pH do meio reacional foi realizado pela adição de solução de NaOH 50% M. Em frascos *Duran*[®], com volume útil de 1000 mL, foram avaliados os perfis de biodegradabilidade anaeróbia da AR de laticínio, empregando-se diferentes inóculos (Etapa 3) e o comportamento das células íntegras livres na hidrólise da AR de laticínio, tanto em microaeração como em anaerobiose (Etapa 4).

Os inóculos avaliados na Etapa 3 foram o lodo anaeróbio granular e a biomassa fúngica, composta de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*. Em todos os ensaios compostos de lodo anaeróbio, a razão gDQO /gSSV foi de 0,4. A quantidade de biomassa fúngica utilizada foi de 10% m/v. Os ensaios foram conduzidos à temperatura de 37°C, pH 7,0, DQO afluente de 4 g/L e em anaerobiose. As condições analisadas foram (1) AR da indústria de laticínio e lodo anaeróbio; (2) AR da indústria de laticínio, lodo anaeróbio e células íntegras livres; (3) AR da indústria de laticínio, lodo anaeróbio e células íntegras imobilizadas e (4) AR da indústria de laticínio e células íntegras livres.

Na Etapa 4, os efeitos da ausência de oxigênio molecular foram avaliados mediante a utilização da biomassa fúngica. Nesta etapa, foram inoculados 66 g de biomassa fúngica (base úmida – 91,1% de umidade), apresentando total de 7500 U, em 900 mL de AR de laticínio. A Tabela 8 apresenta as condições de operação dos ensaios em batelada referente a avaliação do metabolismo das células íntegras na biodegradação da AR de laticínio.

Tabela 8 - Parâmetros e condições operacionais da etapa de avaliação dos perfis metabólicos na biodegradabilidade da água residuária de laticínio utilizando células íntegras livres do fungo filamentosso *P. citrinum*.

Condição	Temp.	pH _i	Vol. de efluente	DQO _i	Ausência de O ₂
5*	37°C	7,0	900 mL	6,2 g/L	Sim
6*	37°C	7,1	900 mL	6,2 g/L	Sim
7*	37°C	6,7	900 mL	6,2 g/L	Não

5 (AR de laticínio/controle - anaeróbio); 6 (biomassa fúngica e AR de laticínio - anaeróbio) e 7* (biomassa fúngica e AR de laticínio - microaeróbio).

5.3.8. Teste hidrodinâmico dos reatores contínuos de fluxo ascendente

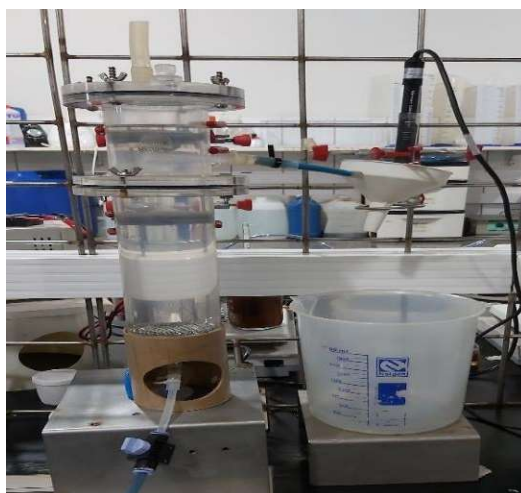
Inicialmente, os reatores foram preenchidos com água de abastecimento, adequando-se a vazão do sistema de acordo com os valores de TDHs teóricos, previamente estabelecidos, conforme mostra a Tabela 9. Os reatores abióticos foram, então, alimentados no modo de injeção tipo degrau, com solução do traçador contendo 10 g/L de cloreto de sódio (NaCl) comercial, conforme metodologia estabelecida por Levenspiel (1999). O tempo de ensaio foi superior a 03 vezes o TDH teórico calculado para cada ensaio.

Tabela 9 - Especificação dos reatores contínuos e seus respectivos valores de tempo de detenção hidráulicos teóricos.

Tipo de reator	Volume útil (L)	TDH teórico
Hidrolítico com biomassa livre – RH1.CBL	0,8	12h
Hidrolítico com leito estruturado – RH1.CLE	0,8	12h
Hidrolítico com biomassa livre – RH2.CBL	1,0	12h
Hidrolítico com leito estruturado – RH2.CLE	1,0	12h
Metanogênico com leito estruturado – AnSTBR1	2,0	42h
Metanogênico com leito estruturado – AnSTBR2	2,0	20h

A Figura 14 apresenta o aparato experimental utilizado para a realização do ensaio hidrodinâmico.

Figura 14 - Ensaio hidrodinâmico do reator RH1.CBL.



Junto à saída do efluente, foi colocada uma sonda de condutividade, acoplada a um sistema de coleta de dados da *Texas Instruments* (CBL 2TM – TI 89), visando a determinação da concentração de sólidos totais dissolvidos (STD). Para a determinação do regime de escoamento predominante nos reatores através dos valores determinados de STD e utilizando-se do modelo proposto por Levenspiel (1999), foi possível traçar a curva C (concentração de traçador *versus* tempo), a curva F (curva C normalizada) e a curva E (curva F diferenciada), representando a última o perfil de distribuição do tempo de residência no reator.

Inicialmente, a curva F de cada ensaio foi ajustada à Sigmóide de Gompertz, conforme mostra a Equação 8. Tal ajuste se fez necessário uma vez que a direta derivação dos dados experimentais pode tornar os resultados não satisfatórios. Assim, a partir dos parâmetros de ajuste da Sigmóide de Gompertz (“a”, “b” e “c”), obteve-se a curva E (Equação 9).

$$C_N = F = a \cdot e^{-e^{-b(t-c)}} \quad \text{Equação 8}$$

em que C_N refere-se à concentração adimensional do traçador (normalizada); “t” o tempo (horas) e “a”, “b” e “c” os parâmetros de ajuste da Sigmóide de Gompertz.

$$\frac{dC_N}{dt} = \frac{dF}{dt} = E = a \cdot b \cdot e^{-b(t-c)} \cdot e^{-e^{-b(t-c)}} \quad \text{Equação 9}$$

Os parâmetros e equações derivadas do modelo analítico de escoamento de

Levenspiel (1999) podem ser observados conforme mostra a Tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros e equações do modelo de caracterização hidrodinâmica de Levenspiel (1999).

Parâmetro	Equação
TDH experimental	$TDH_e = \frac{\int_0^{\infty} t \cdot E(t) \cdot dt}{\int_0^{\infty} E(t) \cdot dt}$
Variância	$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - THD_e)^2 \cdot E(t) \cdot dt$
Variância adimensional	$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{TDH_e^2}$
E adimensional	$E_{\theta} = THD_e \cdot E$
Tempo adimensional	$\theta = \frac{t}{TDH_e}$

Fonte: adaptado de Damasceno (2008).

O regime de escoamento predominante no interior dos reatores foi avaliado pelo número de dispersão (D/u.L) conforme proposto por Danckwerts (1953), para o ensaio tipo degrau, e mostrado na Equação 10.

$$\left(\frac{c}{c_{máx}}\right)_{degrau} = F = \frac{1}{2} \cdot \left[1 - \operatorname{erf}\left(\frac{1}{2} \cdot \sqrt{\frac{u \cdot L}{D}} \cdot \frac{\left(1 - \frac{\theta}{TDH_e}\right)}{\sqrt{\frac{\theta}{TDH_e}}}\right)\right] \quad \text{Equação 10}$$

O ajuste dos dados experimentais às equações descritas anteriormente foi realizado utilizando-se o *software R*.

5.3.9. Sequenciamento genômico para identificação taxonômica da comunidade microbiana dos reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos

Amostras ambientais microbianas foram submetidas ao processo de extração do ácido desoxirribonucleico (DNA), utilizando-se o *FastDNATM Spin Kit for Soil* e metodologia fornecida pelo fabricante (*MP Biomedicals*). A Tabela 11 representa as condições das amostras extraídas, além dos *primers* (oligonucleotídeos) utilizados na etapa de sequenciamento genômico para caracterização taxonômica.

Tabela 11 - Parâmetros das amostras ambientais microbianas para sequenciamento.

Amostra	Condição	Domínio	Primer
1	AR bruta	<i>Bactéria/Archaea</i>	<i>V3-V4 16S rRNA</i>
2	RHA1 e RHA2*	<i>Bactéria/Archaea</i>	<i>V3-V4 16S rRNA</i>
3	RH3 a RH5**	<i>Bactéria/Archaea</i>	<i>V3-V4 16S rRNA</i>
4	AnSTBR1***	<i>Bactéria/Archaea</i>	<i>V3-V4 16S rRNA</i>
5	AnSTBR1***	<i>Fungi</i>	<i>ITS1_F/ITS2_R</i>
6	AnSTBR2****	<i>Bactéria/Archaea</i>	<i>V3-V4 16S rRNA</i>
7	AnSTBR2****	<i>Fungi</i>	<i>ITS1_F/ITS2_R</i>

*RHA1 e RHA2 = reatores hidrolíticos/fermentativos autoinoculados; **RH3 a RH5 = reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*; *** AnSTBR1 = reator anaeróbio de leite estruturado alimentado com AR bruta e **** AnSTBR2 = reator anaeróbio de leite estruturado alimentado com AR pré-tratada.

A fim de se verificar a integridade do DNA extraído, técnica de eletroforese em gel de agarose (EGA) foi realizada, conforme metodologia apresentada por Scoma et al. (2011). Aliquotas de 4 µL das amostras de soluções do DNA extraído foram utilizadas. Ao gel de agarose 0,8%, foi adicionado Brometo de Etídio e a corrida foi conduzida a 220 V, por período de 45 min. As imagens digitais foram tiradas, sob luz ultravioleta, utilizando-se transluminador *L.PIX Imagem molecular* da *Loccus Biotecnologia*.

Para a checagem da qualidade e concentração das soluções de DNA, a técnica de espectrometria de absorção no ultravioleta (EUV) foi empregada (NELSON; COX, 2017), em espectrômetro *NanoDrop® 2000 - Thermo Scientific*, com *software NanoDrop 2000/2000c-Thermo Scientific*.

A identificação taxonômica dos microrganismos foi realizada pela empresa *NGS Soluções Genômicas*, sediada no município de Piracicaba-SP, onde foi realizada a amplificação do DNA das amostras ambientais, com *set de primers* para região 16S V3-V4 das amostras 1, 2, 3, 4 e 6 e ITS1_F-ITS2_R das amostras 5 e 7, combinado com a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), inclusão dos *barcodes*, *pool* das amostras, quantificação do *pool*, sequenciamento metagenômico (2x150pb ou 2x250pb, média de cobertura de 50.000 *paired-end reads* por amostra) e análise de bioinformática básica.

5.4. Metodologia analítica

A Tabela 12 apresenta os principais métodos analíticos utilizados para o desenvolvimento da pesquisa.

Tabela 12 - Métodos analíticos.

Parâmetro	Método	Referência
Acidez Total	Titulométrico	IAL (2008)
Alcalinidade	Titulométrico/Potenciométrico	Ripley et al. (1986)
Ácidos Voláteis	Titulométrico/Potenciométrico	Dilallo & Albertson (1961)
Ácidos Orgânicos	Cromatografia Líquida	Mesquita et al. (2013)
Composição do Biogás	Cromatografia Gasosa	Perna et al. (2013)
Carboidratos Totais	Espectrofotométrico	Dubois et al. (1956)
DQO	Espectrofotométrico	APHA (2012)
Glicerol	Espectrofotométrico	Greenhill (2003)
pH	Potenciométrico	APHA (2012)
Proteínas Totais	Espectrofotométrico	Lowry et al. (1951)
Sól. S. Totais (SST)	Gravimétrico	APHA (2012)
Sól. S. Voláteis (SSV)	Gravimétrico	APHA (2012)
Sól. S. Fixos (SSF)	Gravimétrico	APHA (2012)
Teor de Umidade	Gravimétrico	APHA (2012)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

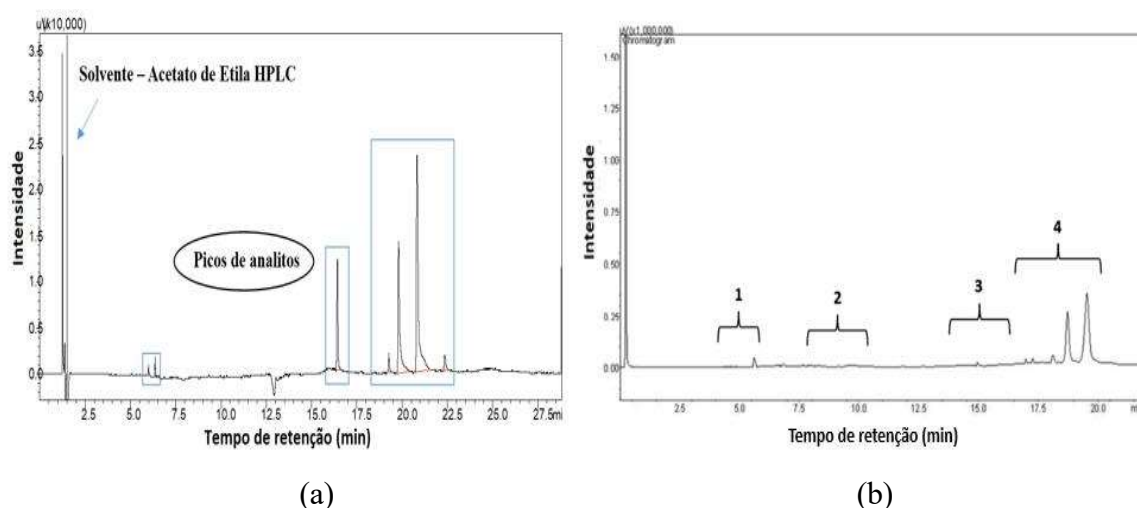
6.1. Avaliação da eficiência da extração líquido-líquido na análise cromatográfica de lipídeos

6.1.1. Cromatografia gasosa (GC-FID)

Para a avaliação do método analítico cromatográfico de identificação/caracterização dos lipídeos presentes na AR da indústria de laticínios, outras matrizes lipídicas e padrões utilizados neste trabalho, e com o objetivo de avaliar a resposta do equipamento sob diferentes concentrações de lipídeos, amostras de diferentes concentrações de padrões do óleo de soja *Liza*[®] comercial (20 a 100 mg/mL de solvente Acetato de Etila grau HPLC) foram injetadas e analisadas.

A Figura 15.a mostra o cromatograma obtido da análise da amostra contendo 50 mg de óleo de soja *Liza*[®] por mL de acetato de etila. Para as demais concentrações de lipídeos, os cromatogramas foram mostrados no *Apêndice A*. A Figura 15.b apresenta o cromatograma obtido dos estudos de Rosset (2011), onde foi utilizado o mesmo cromatógrafo (*Shimadzu*[®] GC-2010), coluna cromatográfica (*BD-EN14103*) e lote do óleo de soja *Liza*[®] da presente pesquisa.

Figura 15 - Cromatograma obtido por GC-FID da amostra contendo (a) 50 mg de óleo de soja *Liza*[®] por mL de solvente Acetato de Etila e (b) * óleo de soja comercial *Liza*[®] - concentração não especificada.



*Fonte: Rosset (2011).

De acordo com a Figura 15.a, observa-se que, ao final da análise cromatográfica, houve a formação de picos de analitos com boa qualidade e intensidade de sinal para a amostra de óleo de soja *Liza*[®] analisada. Ainda, não houve a sobreposição do pico do solvente, utilizado na preparação e diluição das amostras, com os picos dos analitos, constituídos estes das frações de lipídeos presentes na matriz (óleo de soja).

Em comparação com o cromatograma obtido por Rosset (2011), Figura 15.b, verifica-se grande similaridade entre os analitos identificados, ao final das análises cromatográficas, para os métodos analíticos propostos. Rosset (2011) utilizou diferentes padrões internos (PIs) para a caracterização das regiões especificadas de 1 a 4 da Figura 15.b. A região 1 compreendeu o tempo de retenção característico dos ácidos graxos, onde esteve relacionado com o uso do PI tricaprina (*Sigma-Aldrich*[®]), também conhecido como tridecanoato do glicerol ou triglicerídeo do ácido cáprico. As regiões 2, 3 e 4 representaram os tempos de retenção característicos dos monoglicerídeos (MAGs), diglicerídeos (DAGs) e triglicerídeos (TAGs), respectivamente. Tais regiões estiveram relacionadas com o uso dos PIs comerciais monooleína para MAG, 1,3-dioleína para DAG e trioleína para TAG (ROSSET, 2011). O cromatograma evidenciando os sinais e os tempos de retenção dos PIs utilizados é mostrado no *Anexo A*.

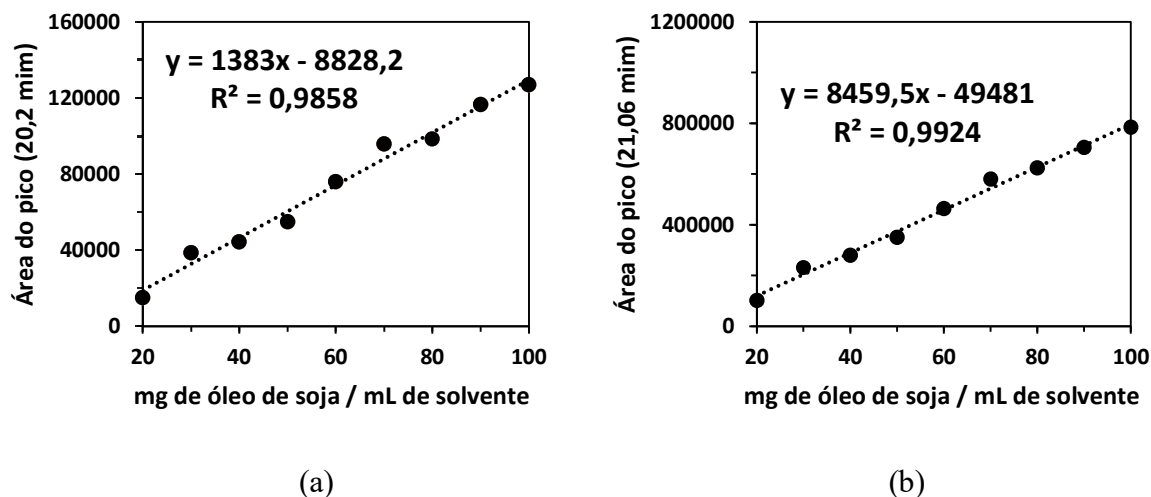
O óleo de soja comercial *Liza*[®] caracterizado por Rosset (2011) e pela presente pesquisa apresentou composição majoritária de triglicerídeos. Ainda, na amostra analisada da presente pesquisa, o pico de analito com tempo de retenção próximo a 16,5 minutos mostra o aumento de diglicerídeos, o que pode ser explicado pela degradação dos triglicerídeos em função do tempo de armazenamento do óleo de soja refinado comercial *Liza*[®] (não lacrado) e utilização nas pesquisas.

Segundo as informações nutricionais especificadas pelo fabricante do óleo de soja *Liza*[®], para cada 13 mL do produto (colher de sopa), são encontrados 12 g de gorduras totais, das quais 1,9 g e 10,1 g pertencem as gorduras saturadas e insaturadas, respectivamente. Os principais representantes dos ácidos graxos como constituintes insaturados do óleo de soja são os ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), enquanto que os ácidos esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0) são constituintes saturados dos ácidos graxos do óleo de soja (LOPES et al., 2004). O tempo de retenção do ácido oleico foi de 7,95 minutos (ROSSET, 2011).

A Figura 16 apresenta a tendência de resposta linear do equipamento em relação aos dois principais picos de analitos obtidos nos cromatogramas, para as diferentes

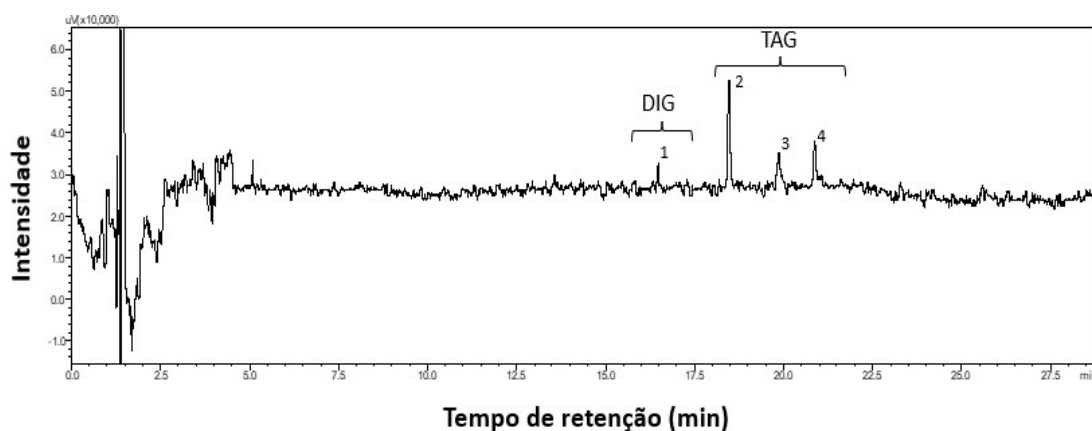
concentrações de lipídeos analisadas, variando-se de 20 a 100 mg de óleo de soja por mL de solvente Acetato de Etila.

Figura 16 - Gráficos obtidos das análises do óleo de soja Liza sob diferentes concentrações para fornecer a equação da reta, o ajuste e a tendência de resposta. (a) Pico de analito em 20,2 minutos. (b) Pico de analito em 21,06 minutos.



Pelas análises obtidas verificou-se que as concentrações de lipídeos analisadas permaneceram dentro da faixa linear de resposta fornecida pelo equipamento frente ao método desenvolvido, a coluna e o cromatógrafo utilizados (Figura 16). A Figura 17 apresenta o perfil do cromatograma obtido por *GC-FID* para o azeite de oliva extra virgem *Carbonell*[®] em concentração de 30 mg/mL em Acetato e Etila, utilizado como PI.

Figura 17 - Cromatograma obtido a partir da análise por *GC-FID* de 30 mg de azeite de oliva/mL de solvente Acetato de Etila.



Ao final da análise cromatográfica, para a amostra contendo azeite de oliva extra

virgem *Carbonell*[®] analisada (Figura 17), pode-se observar a eluição e separação de três picos de analitos dentro da região característica dos triglicerídeos (TAGs). Tais analitos observados evidenciam a possível presença de triglicerídeos ésteres como constituintes do azeite de oliva (CARDOSO et al., 2010). Assim como fora apresentado para o óleo de soja *Liza*[®], de acordo com a especificação do fabricante do azeite de oliva extra virgem *Carbonell*[®], na porção de 13 mL de azeite (uma colher de sopa) são encontrados 12 g de gorduras totais, sendo 1,7 g de gorduras saturadas, 9,3 g de gorduras mono-insaturadas e 1 g de gordura poli-insaturada. Entre os ácidos graxos saturados mais comumente encontrados no azeite de oliva extra virgem estão o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0). Nos ácidos graxos insaturados destaca-se a presença do ácido oleico (C18:1), o ácido linoleico (C18:2), o ácido linolênico (C18:3) e o ácido palmitoleico (C16:1), também conhecidos como ômega 9, 6, 3 e 7, respectivamente (CARDOSO et al., 2010; MELLO; PINHEIRO, 2012). Entretanto, para a amostra azeite de oliva extra virgem *Carbonell*[®] analisada, não foram observados analitos com tempo de retenção referente aos ácidos graxos e aos monoglicerídeos.

Devido à falta de utilização de diferentes PIs para identificação dos picos de analitos formados ao final das corridas cromatográficas, não foi possível identificar cada pico dentro das frações de lipídeos (ácidos graxos, MAG, DAG e TAG) presentes nas amostras injetadas e analisadas por cromatografia *GC-FID*.

6.1.2 *Avaliação da eficiência da extração líquido-líquido de lipídeos utilizando diferentes solventes orgânicos*

As fases orgânicas concentradas, resultantes do processo de extração líquido-líquido, utilizando Acetato de Etila, Acetonitrila, Clorofórmio, *n*-Hexano e a mistura Clorofórmio/Metanol (2:1) foram avaliadas para a determinação da eficiência da extração das frações de lipídeos presentes, inicialmente, nas amostras de AR de laticínio.

A Figura 18 demonstra os procedimentos de extração dos lipídeos, presentes nas amostras da AR de laticínio, para posterior análise cromatográfica em *GC-FID*. A Figura 19 apresenta os cromatogramas obtidos para os diferentes tipos de solventes utilizados nesta etapa.

Figura 18 – (a) Extração e separação de fases, em funil de separação, pela adição do solvente extrator na amostra contendo lipídeos; (b) evaporação do solvente extrator, na fase de interesse, em rotaevaporador e (c) obtenção do concentrado para análise cromatográfica.



(a)

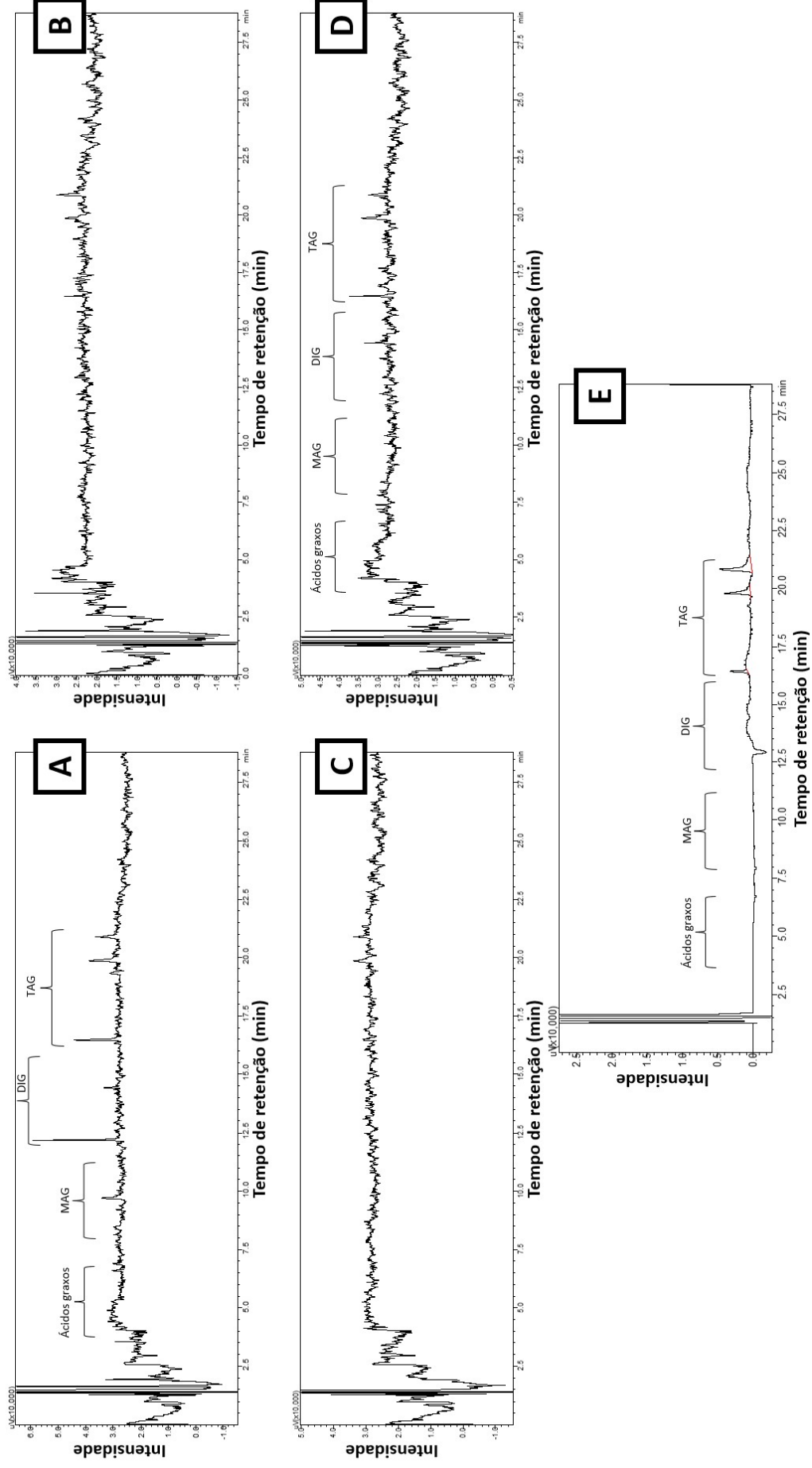
(b)

(c)

De acordo com a Figura 19, somente a utilização de Acetato de Etila, *n*-Hexano e a mistura de Clorofórmio/Metanol (2:1), como solventes extratores, apresentaram picos de analitos observáveis, referentes as frações de lipídeos presentes na AR de laticínio, para o método cromatográfico empregado. Esses resultados podem ser atribuídos em função das diferentes propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos utilizados nas extrações.

Melhores resultados de extração mediante a utilização dos solventes como o Acetato de Etila, *n*-Hexano e Acetato de Metila foram descritos nos estudos realizados por Da Silva e Silva (2016), na avaliação dos rendimentos de extração do óleo de sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus*). Tonial et al. (2009) avaliaram diversos métodos de extração lipídica e seus efeitos sobre a caracterização e a quantificação de ácidos graxos poli-insaturados em leite bovino. Nestes estudos os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao teor de lipídeos totais nos métodos avaliados. Contudo, mediante o uso do método de Bligh e Dyer, com Clorofórmio, Metanol e Água (1:2:0,8), as maiores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados foram obtidas com este sistema extrativo de solventes.

Figura 19 - Cromatogramas resultantes das extrações de lipídeos de AR de laticínios com: (a) Acetato de Etila, (b) Acetonitrila, (c) Clorofórmio, (d) n-Hexano e (e) mistura de Clorofórmio/Metanol (2:1). Concentração das amostras injetadas de 30 mg/mL de solvente Acetato de Etila.



A utilização de álcool etílico como solvente extrator pode gerar resíduos de éter etílico e interferir na identificação/quantificação dos ácidos graxos presentes na gordura do leite. Os álcoois, como o metanol, etanol e isopropanol, podem eluir na região dos ácidos graxos de cadeia curta e do hidroxitolueno butilado (BHT) (antioxidante). O BHT presente no éter etílico elui próximo de C14:0 (ácido mirístico), interferindo na caracterização e quantificação dos ácidos graxos (ANTONIASSI et al., 2017).

Nos estudos realizados por Prestes et al. (2011) e Ferronato (2018), os autores empregaram a acetonitrila como solvente extrator de óleos vegetais, destacando que a extração com acetonitrila removeu da matriz uma menor quantidade de coextrativos comparado com solventes mais apolares. Contudo, a extração com acetonitrila tem sido amplamente utilizada em métodos de determinação de resíduos de agrotóxicos, em alimentos e matrizes ambientais (FERRONATO, 2018).

Em função dos resultados obtidos e dentre os três tipos de solventes que apresentaram a separação das frações de lipídeos do afluyente de AR da indústria de laticínio, a utilização do solvente constituído pela mistura de Clorofórmio/Metanol foi o que apresentou o melhor desempenho, sendo selecionado para as demais análises cromatográficas dentro do método utilizado.

6.1.2.1. Derivatização das amostras contendo lipídeos com solução de diazometano

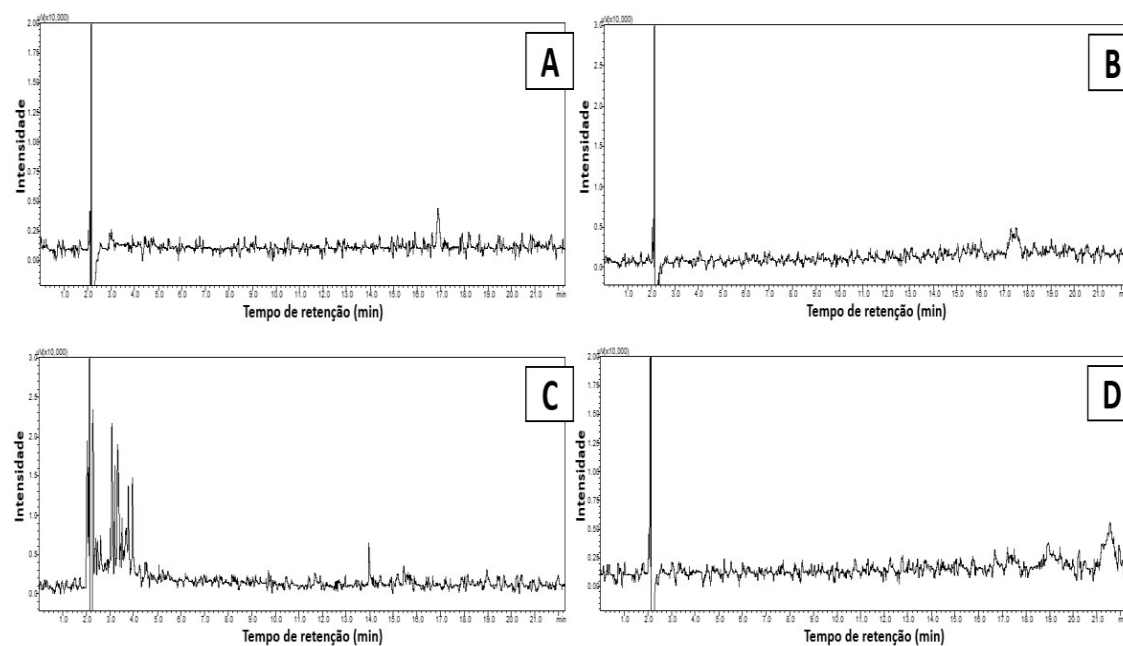
Considerando uma possível sobreposição de picos de analitos e objetivando-se a melhoria da identificação via técnica de cromatografia gasosa, o processo de metilação de amostras lipídicas se torna uma técnica útil para a separação de misturas de AGCL contendo o mesmo número de carbonos, saturados e insaturados (IKEDA et al., 1982; METCALF; SCHMITZ, 1961). Neste contexto, ácidos graxos como o ácido esteárico (C18:0) e o ácido oleico (C18:1), entre outros, podem apresentar sobreposição de picos durante a análise cromatográfica, podendo levar a interpretação de resultados não reais.

Segundo Metcalf e Schmitz (1961), o tratamento de amostras contendo AGCL com solução de diazometano, faz com que tais ácidos graxos sejam convertidos em seus respectivos ésteres metílicos. O que pode ser fator essencial para identificação via técnica de cromatografia a gás, em função do método e o tipo de coluna utilizada. Uma vez que o grupo carboxila presente nos ácidos graxos são muito polares (SOLOMONS; FRYHLE, 2002), estes tendem a apresentar forte interação com a fase estacionária da

coluna cromatográfica, geralmente composta de sílica com grupos siloxanos. Ao eluirm, os ácidos carboxílicos podem sair como bandas largas (picos não definidos) (TOYO'OKA, 1999; TOYO'OKA, 2002). Assim, a derivatização do grupo carboxila, via metilação com diazometano, faz com que os ésteres metílicos eluem mais facilmente pela coluna, por ser menos polar que o grupo carboxila dos ácidos graxos, permitindo-se a separação dos analitos e formando-se picos mais definidos (TOYO'OKA, 1999; LIMA; ABDALLA, 2002).

Amostras contendo lipídeos extraídos da AR bruta de laticínio com os solventes extratores *n*-Hexano e Acetonitrila foram submetidas ao processo de metilação com solução de diazometano. A Figura 20 apresenta a comparação entre os cromatogramas das amostras metiladas e seus respectivos brancos (extrato da AR bruta de laticínio).

Figura 20 – Cromatogramas obtidos por *GC-FID* das amostras contendo lipídeos da AR de laticínio: (a) extraídos com Acetonitrila; (b) extraídos com Acetonitrila e metilada; (c) extraídos com *n*-Hexano e (d) extraídos com *n*-Hexano e metilada.



De acordo com a Figura 20, o emprego do processo de metilação das amostras não foram determinantes para a detecção de analitos, anteriormente, não observados. Possivelmente, a extração dos lipídeos com Acetonitrila e *n*-Hexano das amostras da AR de laticínio não apresentou ácidos graxos livres em concentrações suficientes para serem metilados e identificados nas análises por *GC-FID*, na forma de seus respectivos ésteres, ou mesmo, estavam ausentes nas amostras.

6.1.3. *Catálise básica da água residuária da indústria de laticínio*

Como parâmetro de auxílio no monitoramento da hidrólise enzimática, alíquotas da AR bruta de laticínio foram submetidas à catálise básica, seguida da adição de ácido clorídrico para a neutralização de cargas, conforme mostrado na Figura 21. A Figura 22 apresenta os cromatogramas do afluente da AR bruta de laticínio e AR bruta de laticínio com pré-tratamento químico realizado, via reação de hidrólise com NaOH, onde os lipídeos foram extraídos por partição líquido-líquido com a mistura de Clorofórmio/Metanol (2:1), concentrados, diluídos em acetado de etila e analisados via *GC-FID*.

Figura 21 – Amostras de AR de laticínio: (a) AR bruta; (b) Reação de hidrólise da AR bruta após a catálise básica com NaOH; (c) Separação de fases da amostra; (d) Neutralização da reação de hidrólise com HCl para posterior extração por partição líquido-líquido, concentração e análise cromatográfica.

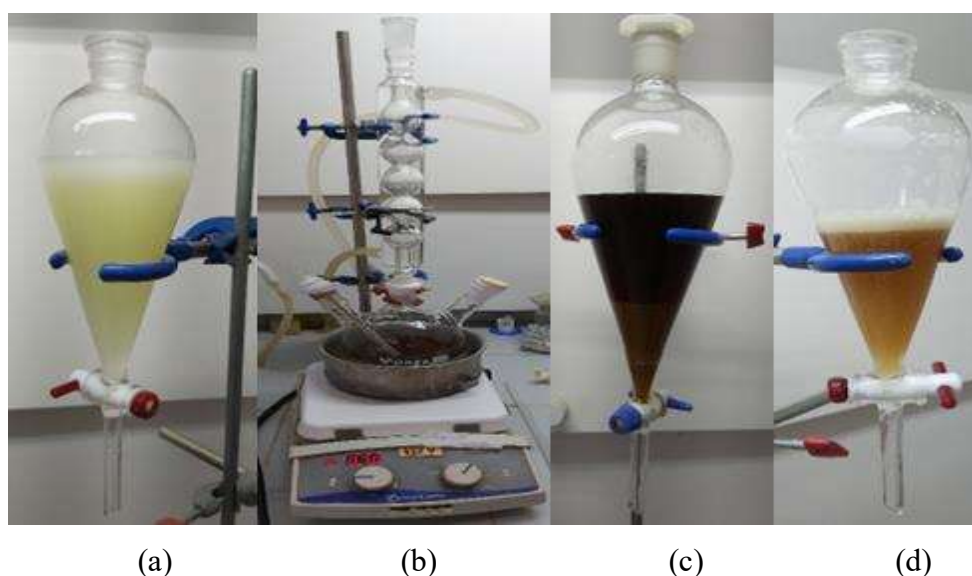
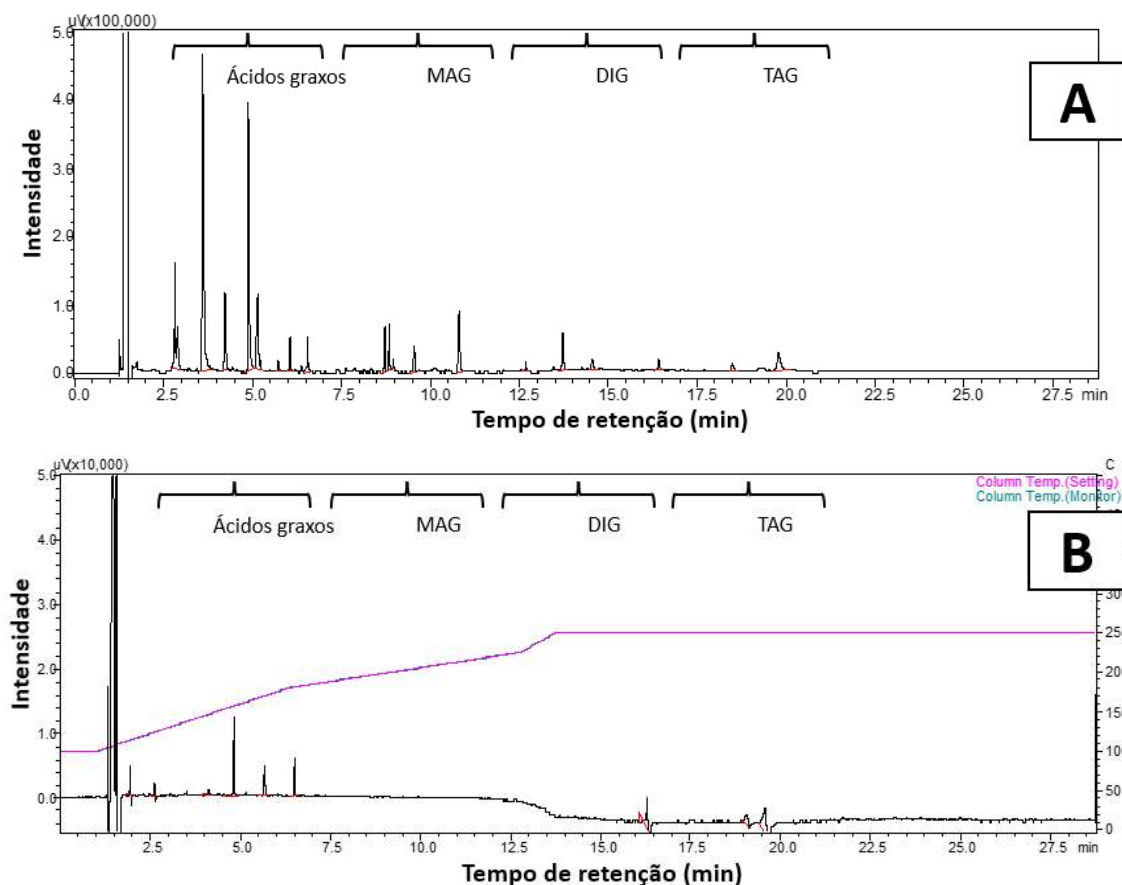


Figura 22 - Cromatogramas obtidos via *GC-FID* do (a) tratamento químico (hidrólise básica) da AR bruta de laticínio e (b) AR bruta de laticínio – controle. Concentração das amostras injetadas de 30 mg/mL de solvente Acetato de Etila.



De acordo com a Figura 22, observa-se que o emprego da catálise básica (pré-tratamento químico) induziu a formação e separação de picos de analitos com boa intensidade de sinal e tempos de retenção variando entre 2 a 20 minutos de corrida cromatográfica. Tal fato foi menos expressivo tanto na diversidade de picos como na intensidade apresentada para o cromatograma controle (afluente bruto). Tais resultados evidenciam a ocorrência da hidrólise (química) e transformação das frações de lipídeos presentes na AR bruta de laticínio.

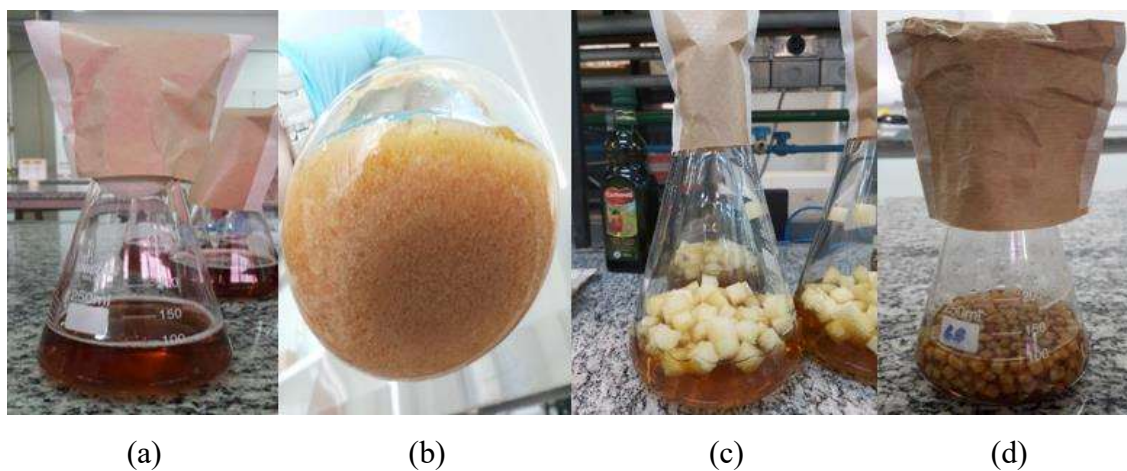
Na caracterização das frações dos lipídeos presentes no biodiesel, produzido via biocatálise, por Rosset (2011), o 1,2,4-butanotriol foi utilizado como PI para a quantificação do glicerol, produzido nas reações de transesterificação enzimática. Segundo Rosset (2011), o glicerol apresentou tempo retenção próximo ao tempo de retenção do solvente (*Anexo B*). Uma vez que o 1,2,4-butanotriol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_3$) é um álcool com três grupos hidroxilas alcoólicas hidrofílicas, este se torna semelhante ao glicerol (SOLOMONS; FRYHLE, 2002; VOLLHARDT; SCHORE, 2004). Na presente

pesquisa, a identificação, via análise cromatográfica, do glicerol formado como produto da hidrólise enzimática dos lipídeos presentes na AR de laticínio, não se adequou como parâmetro de monitoramento da hidrólise devido a possível sobreposição com o pico do solvente utilizado.

6.2. Determinação da atividade lipolítica das células íntegras de *P. citrinum*

Com o intuito de avaliar os efeitos da aplicação de células íntegras ativas e estáveis do fungo filamentososo *P. citrinum* no processo de hidrólise e metanogênese da AR da indústria de laticínio, ainda na Etapa 1, cultivos celulares em meio de cultura líquido foram realizados. A Figura 23 mostra as células íntegras produzidas ao final de 96 horas de cultivo celular, em *Shaker*.

Figura 23 - (a) Meio de cultura líquido para o cultivo de células íntegras livres; (b) células íntegras livres em meio de cultura; (c) meio de cultura líquido para o cultivo de células imobilizadas em espumas PU; (d) células íntegras imobilizadas.



Após processo de separação da biomassa fúngica do meio de cultura líquido, as células íntegras originadas foram secas em dessecador, por um período de 24h, e a análise de umidade da biomassa foi realizada, apresentando teor de umidade de $38,9 \pm 0,2\%$ para a biomassa livre e de $29,4 \pm 1,9\%$ para a biomassa imobilizada. Testes de atividade enzimática foram realizados sobre amostras da biomassa livre e imobilizada, indicando valores médios de $56,1 \pm 1,9$ U/g e $78,9 \pm 1,1$ U/g, respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzimas necessárias para liberar 1 mol de ácidos graxos livres por minuto nas condições do

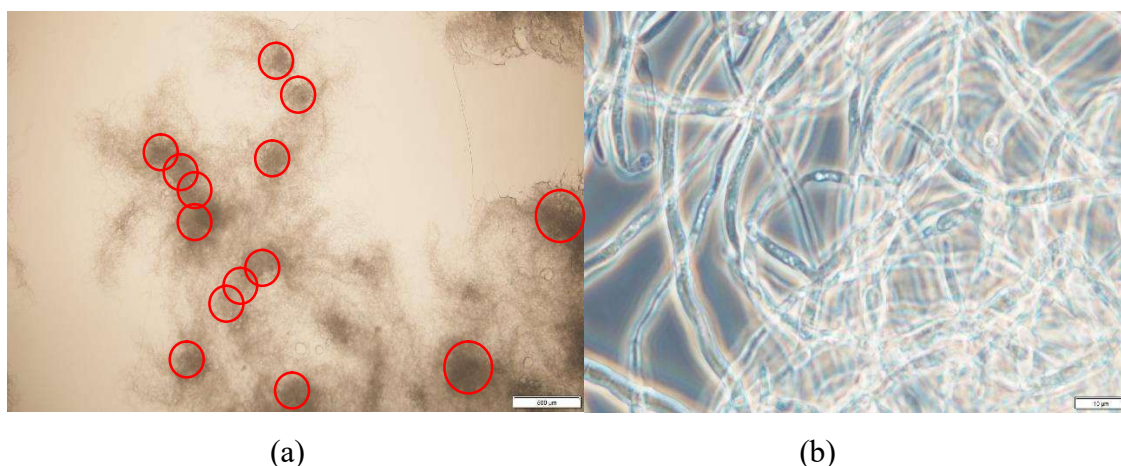
ensaio (37°C, pH 7,0 e agitação de 150 rpm) (ANDRADE et al., 2012).

Apesar de apresentarem crescimento celular, porém, em tamanho reduzido, os valores de atividade enzimática obtidos foram abaixo do esperado, mostrando grande discrepância em relação aos valores obtidos por Alves et al. (2019) e Lima et al. (2019). Segundo os autores, valores de até 240 U/g foram encontrados para a biomassa fúngica livre e de até 210 U/g para a biomassa fúngica imobilizada em espuma PU, após processo de filtração e secagem para o mesmo microrganismo.

Cui et al. (1998) estudaram a morfologia apresentada pelos fungos filamentosos durante o crescimento celular empregando a técnica de fermentação submersa. Segundo os autores, a intensidade de agitação e a disponibilidade de oxigênio dissolvido (OD) são dois fatores fundamentais capazes de alterar significativamente a morfologia dos fungos. Em agitações mais rigorosas, “*pellets*” de tamanhos reduzidos e em menores concentrações na biomassa são formados, enquanto sob mesma intensidade de agitação, o tamanho do “*pellet*” dificilmente é afetado pela concentração de OD. Porém, a fração de micélio diminui levemente com o aumento da concentração de OD no meio.

Análises de microscopia óptica foram realizadas em amostras da biomassa livre cultivada, conforme visualizado pela Figura 24.

Figura 24 – (a) Micrografia óptica de luz comum das células íntegras livres e (b) aproximação com contraste de fase (aumento de 1250X).



Na Figura 24, visualiza-se a conformação dos “*pellets*” de células íntegras produzidas, por meio do emaranhado de filamentos do fungo *P. citrinum*, capaz de agir como uma matriz natural às enzimas lipolíticas sintetizadas. De acordo com a Figura 24.a e 23.b, é possível observar que as células íntegras livres produzidas apresentaram

formas reduzidas e pouco compactas, corroborando os resultados apresentados por Cui et al. (1998). As regiões delimitadas em vermelho apresentam visão macroscópica dos “*pellets*” produzidos.

Testes de atividade enzimática foram realizados sobre o meio de cultura líquido, livre de células íntegras, obtendo-se valores de $23,2 \pm 1,0$ U/g para o filtrado das células íntegras livres e de $21,6 \pm 1,3$ U/g para o filtrado das células íntegras imobilizadas. Tal resultado pode indicar possível excreção de parcela das enzimas lipolíticas produzidas para o meio líquido.

Para dar seguimento ao trabalho, novos cultivos celulares foram realizados, porém, após processo de separação do meio de cultura líquido, por filtração a vácuo, as células íntegras produzidas não foram compactadas e secas em dessecador. Os testes de atividade enzimática indicaram aumento expressivo de atividade das células íntegras cultivadas, apresentando valor médio de $195,4 \pm 8,1$ U.g⁻¹ para a biomassa úmida e de $1425,3 \pm 27,2$ U.g⁻¹ para a biomassa fúngica seca, em conversão direta. O teor de umidade da biomassa cultivada foi de $87,5 \pm 2,9\%$. A atividade enzimática do filtrado, livre de células íntegras, apresentou valor médio de 13 ± 4 U.g⁻¹, similar aos valores apresentados nos cultivos iniciais. Por meio da análise dos dados obtidos, observa-se redução expressiva da atividade enzimática quando esta é compactada, ainda no processo de separação do meio líquido, por filtração a vácuo.

A utilização das células íntegras fúngicas em sua forma natural, como “*pellets*”, não compactados, traz vantagens mediante a sua aplicação em reatores contínuos biológicos para o tratamento de ARs, uma vez que há melhor distribuição da biomassa fúngica por todo o volume útil do reator, fato não observado quando empregado a biomassa fúngica compactada. Ainda, até presente momento, não há relatos sobre o uso de biomassa (células íntegras) não compactadas e com elevado teor de umidade como inóculo em reatores biológicos para o tratamento de águas residuárias.

6.3. Avaliação da constante de desativação e tempo meia vida enzimática

Na Etapa 2 do presente projeto, assumindo-se que a síntese enzimática das células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* partem de um modelo microbiológico não segregado e não estruturado, o modelo de Michaelis-Menten pode ser usado para expressar a cinética enzimática (LEVENSPIEL, 1999). Após cultivo das células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, alíquotas foram submetidas à avaliação de atividade

enzimática. Verificou-se que as células íntegras sintetizadas estavam ativas em função de seus valores de atividade enzimática, indicando a presença de enzimas lipolíticas, conforme mostra da Tabela 13.

Tabela 13 - Valores de atividade enzimática e teores de umidade para os cultivos celulares do fungo filamentososo *P. citrinum*.

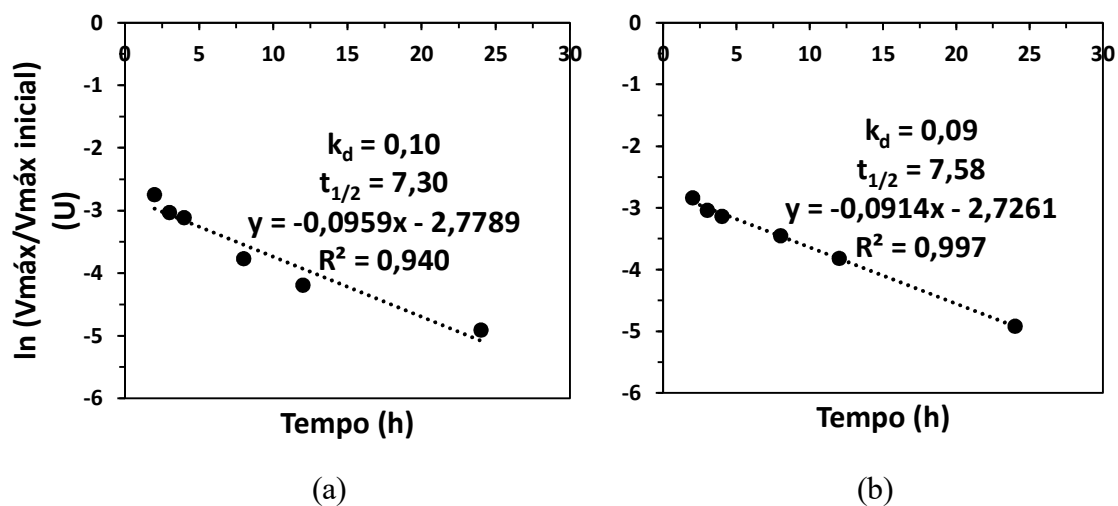
	Atividade enzimática inicial (U/g)*	Teor de umidade (%)
Cultivo 1	136,9	91,04
Cultivo 2	225,5	87,7
Cultivo 3	170,3	84,4
Cultivo 4	195,3	87,3
Cultivo 5	212,5	80,8
Cultivo 6	168,9	87,2
Cultivo 7	201,9	86,1

* base úmida

Sob diferentes concentrações de substratos lipídicos no meio reacional, 52,6 g/L (5,2% m/v) e 30 g/L (3% m/v), foram avaliadas as constantes de degradação (k_d) e o tempo de meia vida enzimático ($t_{1/2}$), das células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum* cultivadas. Ensaios em batelada à 37°C e 120 rpm forneceram requisitos para o cálculo de k_d e $t_{1/2}$.

A Figura 25 apresenta os valores de k_d e $t_{1/2}$ para as condições do ensaio.

Figura 25 – Constante de desativação e tempo de meia vida enzimática para concentração de lipídeo no meio reacional de (a) 5,2% m/v e (b) 3% m/v.

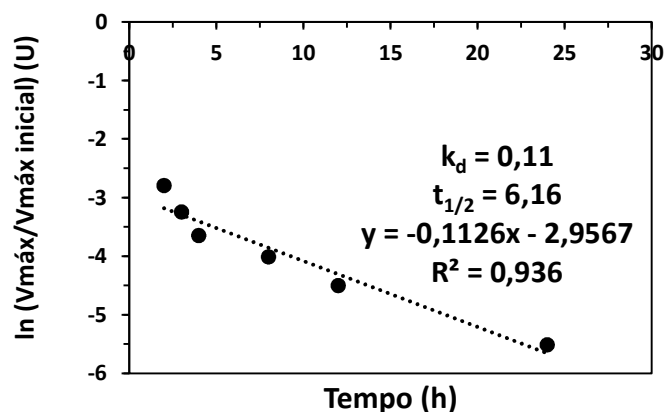


Por meio da Figura 25, pode-se verificar que a redução da carga lipolítica (5,2% para 3% m/v), nas mesmas condições do ensaio, não levou ao aumento significativo do valor apresentado pelo tempo de meia vida enzimático e a redução da constante de desativação enzimática. Tal porcentagem de lipídeos no meio (3% m/v) é muito próximo ao encontrado na principal matéria prima geradora da AR da indústria de lácteos, o leite.

A redução da carga de lipídeo inicial leva ao menor requerimento dos sítios ativos disponíveis, fazendo-se com que a quantidade de enzimas presentes na carga reserva aumente, fato menos observado quando se aumenta a carga de substrato até atingir o ponto de saturação (LEVENSPIEL, 1999; SCHMIDELL et al., 2001). Valores da concentração de substrato maiores que o valor apresentado pelo ponto de saturação, podem levar à inibição enzimática pelo substrato. Neste sentido, o próprio substrato passa a inibir a atividade catalítica apresentada pelas enzimas, reduzindo-se a velocidade de reação e comprometendo a eficiência do processo enzimático (BAILEY; OLLIS, 1986; LEVENSPIEL, 1999; SCHMIDELL et al., 2001).

A própria AR da indústria de laticínio com teor de lipídeos próximos a 3% m/v foi utilizada, em substituição à emulsão sintética composta por azeite e oliva, água e goma arábica. Neste contexto, a avaliação dos parâmetros cinéticos de k_d e $t_{1/2}$, mantendo-se a temperatura de 37°C e 120 rpm, foi realizada. A Figura 26 apresenta o ajuste ao modelo cinético de degradação enzimática em função das atividades enzimáticas apresentadas para diferentes tempos reacionais, utilizando-se a AR como fonte de substrato.

Figura 26 - Constante de desativação e tempo de meia vida enzimática utilizando a própria AR de laticínio como substrato.



Em comparação com os valores apresentados pela carga de lipídeos de 3% m/v utilizando emulsão sintética de lipídeos, houve aumento do valor da constante de desativação enzimática, a diminuição do tempo de meia vida e pior ajuste ao modelo cinético de degradação gerado. Tais efeitos podem ser atribuídos à maior complexidade dos constituintes da AR utilizada em substituição ao meio sintético.

A variável tempo de meia vida enzimática foi utilizada como um dos principais parâmetros de monitoramento do processo de hidrólise enzimática, em reatores contínuos. Uma vez que, sabendo-se a quantidade de enzimas presentes no processo de inoculação, espera-se que a hidrólise cesse em função do tempo de meia vida calculado. Fato contrário traz indícios que há a reposição das enzimas no meio reacional, sintetizadas pelas células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum*, nas condições do ensaio.

6.4. Ensaio preliminares da hidrólise enzimática associada à metanogênese

Na Etapa 3, ensaios em batelada foram conduzidos (Figura 27), sob anaerobiose e à temperatura de 37°C, a fim de avaliar o desempenho de quatro biomassas distintas sobre o processo de hidrólise enzimática/metanogênese da AR da indústria Laticínio Hopelat.

Figura 27 – Frascos batelada da (a) condição 1 - AR da indústria de laticínio e lodo anaeróbico e (b) condição 4 - AR da indústria de laticínio e biomassa fúngica.



(a)

(b)

Em reatores metanogênicos, a maior parte dos trabalhos envolvendo a aplicação da DA de ARs reportam a faixa de temperatura mesofílica de 35-37°C como ideal para o desenvolvimento do processo de digestão (ARIKAN, 2015; BOHN; BJÖRNSSON; MATTIASSON, 2007). A produção de metano na faixa de temperatura mesofílica (32 – 40°C) é menos afetada por flutuações de temperatura de até $\pm 3^\circ\text{C}$ do que quando comparada com o desenvolvimento da metanogênese na faixa de temperatura psicrófila (15 – 25°C) e termofílica (50 – 60°C) (ZUPANCIC, 2003). Temperaturas menores que 20°C afetam fortemente a taxa de produção de biogás (BELLA; RAO, 2021). Em relação a influência da temperatura sobre a concentração de metano no biogás, esta é maior quando o processo se desenvolve entre a faixa de temperatura de 32 a 35°C (ALVES et al., 2009).

Uma vez que a AR de laticínio apresenta elevada temperatura, logo após ser gerada, em consequência do processamento do leite e produtos lácteos nas unidades fabris, o emprego do processo de DA à temperatura de 37°C descarta a necessidade de gasto energético com o aquecimento e controle do sistema. A Tabela 14 apresenta a caracterização físico-química do afluente bruto de laticínio utilizado nesta etapa.

Tabela 14 - Características físico-químicas da AR da indústria de Laticínio Hopelat.

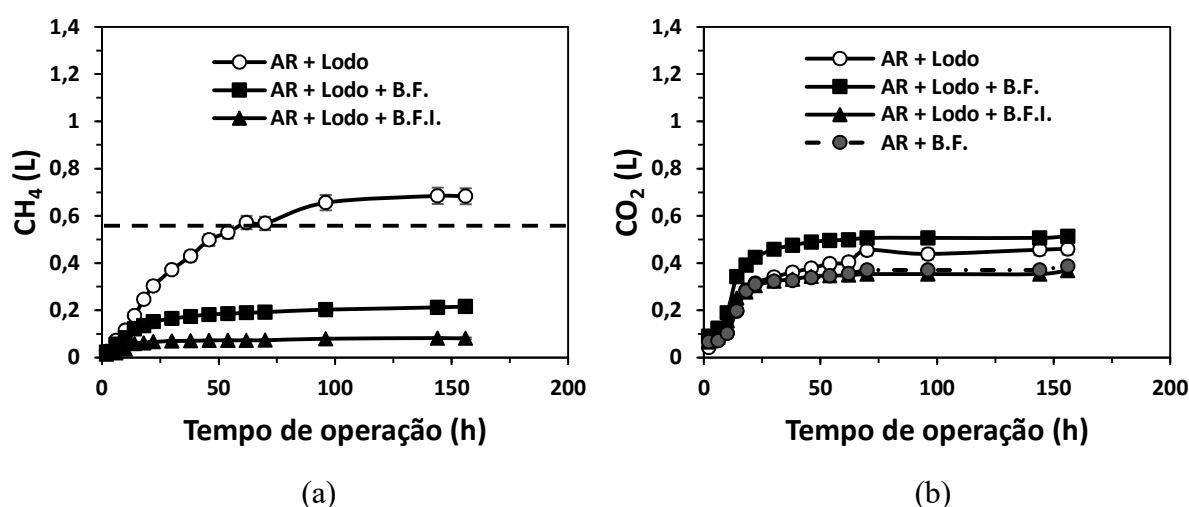
Característica	Valor	Unidade
pH	4,68 \pm 0,01	-
DQO	39.600 \pm 5.141	mg/L
Carboidratos Totais	24.110 \pm 1.400	mg/L
Proteínas Totais	5.120 \pm 2000	mg/L
Lipídeos Totais	820 \pm 200	mg/L
Glicerol	870 \pm 200	mg/L
Ácidos Graxos	36 \pm 1	mmol/L
Sólidos Totais	86 \pm 15	g/L
Sólidos Voláteis	83 \pm 15	g/L
Sólidos Fixos	3,7 \pm 0,3	g/L

Neste contexto, 1 kg de lipídeo da AR de laticínio contribui para aproximadamente 3 kg de DQO e 0,89 kg de DBO; 1 kg de lactose contribui para 1,13 kg de DQO e 0,65 kg de DBO; já 1 kg de proteína contribui para 1,36 kg de DQO e

1,03 kg de DBO (AHMAD et al., 2019; BIRWAL; PRIYANKA, 2017).

Em virtude da elevada concentração de MO (39.600 mg DQO/L), os ensaios preliminares foram conduzidos com fator de diluição de 10. Ao final de 156 horas de ensaio, pode-se observar o perfil de metano e gás carbônico acumulado, Figuras 28.a e 28.b, respectivamente, para as quatro biomassas testadas sob os mesmos requisitos operacionais e ambientais.

Figura 28 - Perfil da produção de (a) metano e (b) gás carbônico acumulado.



AR = água residuária de laticínio; Lodo = lodo granular anaeróbio; B.F = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum* e B.F.I = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum* e imobilizadas em cubos de poliuretano.

De acordo com a Figura 28.a, a maior produção de metano foi observada nos ensaios contendo apenas AR diluída e lodo anaeróbio, apresentando potencial de formação de metano acima da produção teórica máxima esperada (linha tracejada), em 70 horas de operação. Tal fato traz indícios da AR ser 100% biodegradável nesta razão de diluição. Partindo-se da relação de que nas condições normais de temperatura e pressão (CNTP) são gerados 0,35 L CH₄/gDQO (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998), chega-se a produção teórica de metano máxima de 0,51 L CH₄, na temperatura de 0°C, e de 0,58 L CH₄, na temperatura de 37°C.

Vale destacar que o cálculo da produção teórica de metano máxima considerou apenas a DQO afluente (AR), presente nos ensaios em batelada, desconsiderando a DQO adicional associada a biomassa inoculada. Além da DQO referente ao lodo anaeróbio, como este não foi lavado com solução isotônica antes da inoculação, a presença de MO residual, proveniente da estação de tratamento de dejetos avícolas,

podem ter influenciado nos perfis de metano e dióxido de carbono acumulados.

Dessa forma, a possível causa para a formação de metano superior ao limite esperado pode ser atribuída à degradação complementar da MO não computada, associada à parcela do lodo anaeróbio inoculado. Entretanto, para o emprego da DA e em virtude dos problemas relatados na literatura, relacionados estes à elevada concentração e acúmulo de lipídeos, bem como o tempo de DA requeridos para o processo convencional, o uso da tecnologia enzimática pode se mostrar benéfica para o processo de tratamento anaeróbio.

Segundo Perle, Kimchie e Shelef (1995), reatores contínuos anaeróbios de altas taxas, operados com ARs de laticínios, apresentam baixas taxas de degradação anaeróbia e problemas de inibição em função dos componentes presentes neste tipo de AR, principalmente, o elevado teor de gorduras e proteínas do leite, como a caseína. Segundo os autores, a caseína não é biodegradada pelas bactérias e arqueias anaeróbias sem período de adaptação e como efeito a longo prazo, o lodo anaeróbio pré-exposto à gordura do leite, tem sua atividade metanogênica reduzida, fato observado pela redução de adenosina trifosfato (ATP) no mesmo. Outros problemas relacionados com a biodegradação anaeróbia convencional da AR contendo elevados teores de lipídeos são a baixa taxa de difusão através da interface membrana-aquosa, geração de odores desagradáveis, entupimento de reatores relacionados com a colmatação de elementos no sistema, a formação de espuma e a formação de escuma no interior dos reatores (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; KA; AS; AYA, 2013; NIMKANDE; BAFANA, 2022).

Ainda de acordo com a Figura 28.a, os ensaios contendo células íntegras, como parte dos constituintes da biomassa inoculada, não apresentaram bom desempenho em relação à etapa de metanogênese, uma vez que a produção máxima de metano se estabilizou abaixo do valor esperado. Tais resultados vão em direção oposta ao que foi apresentado por Ferreira et al. (2021). Segundo Ferreira et al. (2021), os ensaios em batelada utilizando células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum* concomitantemente com o lodo anaeróbio granular, para a DA da indústria de laticínio, apresentaram maiores taxas de produção de metano de até 231 mL de CH₄/gSV, após 45 horas de ensaio, quando comparados com a biodegradação utilizando somente o lodo granular anaeróbio como inóculo (131 mL de CH₄/gSV).

Ao utilizar células íntegras concomitantemente com lodo anaeróbio, a inibição das arqueias metanogênicas, devido à presença dos fungos filamentosos, pode ter ocorrido. Fatores como a excreção e o acúmulo de metabólitos estão associados com

fatores de inibição. Neste sentido, a elevada taxa de hidrólise, observada em função da alta concentração de ácido oleico no meio reacional, como produto da hidrólise de lipídeos, foi atribuída como fator de inibição das arqueias metanogênicas nos estudos realizados por Perle, Kimchie e Shelef (1995). Langer et al. (2019) estudaram a resposta de bactérias, arqueias e fungos presentes em reatores anaeróbios. Segundo os autores, visando a conservação de energia, os fungos presentes em reatores anaeróbios degradam a MO para a produção de CO₂ e etanol, corroborando os estudos de Saddler & Chan (1982), Gong et al. (1981) e Gervais & Sarrette (1990).

Assim, em digestores anaeróbios metanogênicos, elevadas concentrações de AGCL e álcoois no meio reacional podem levar à toxicidade por substrato, enquanto elevadas concentrações amônia podem levar à toxicidade por produto (SPEECE, 1996). Nos estudos realizados por Vidal et al. (2000) sobre a influência de gorduras e proteínas na biodegradabilidade da AR de laticínio, a biodegradação das proteínas da AR produziu concentração de amônia livre próxima aos níveis inibitórios (62,2 mg/L) à metanogênese.

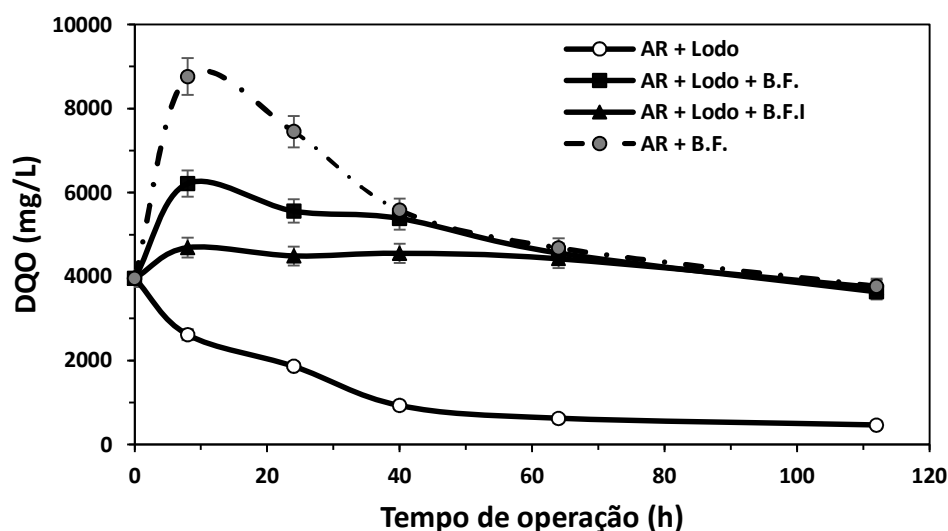
Outro processo metabólico denominado de fermentação da amônia, também conhecida como redução dissimilatória de nitrato para amônio (RDNA) ou amonificação do nitrato, é relatado como sendo uma capacidade metabólica adicional de fungos sob condições anaeróbias (AN; GARDNER, 2002; LANGER et al., 2019; JEBARAJ et al., 2010). Para que a RDNA ocorra, a presença de compostos inorgânicos oxidados de nitrogênio, como nitratos e nitritos, é fundamental. Assim, os elétrons doados pela MO, para a redução dos compostos de nitrogênio, também justificariam a queda da metanogênese nos ensaios híbridos, biomassa anaeróbia e biomassa fúngica na mesma unidade, devido à competição heterotrófica entre os microrganismos eucariontes e procariontes. Em função dos dados apresentados na literatura científica, não são relatadas concentrações detectáveis de compostos oxidados de nitrogênio na AR de laticínio (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; SLAVOV, 2017).

De acordo com a Figura 28.b, é possível observar elevadas concentrações de CO₂, como produto da fermentação e como consequência natural do metabolismo dos microrganismos presentes em cada condição analisada. Dessa forma, os resultados mostram fortes indícios de que os fungos filamentosos de *P. citrinum* apresentam metabolismo sob anaerobiose. Tal resultado vai de contramão aos estudos apresentados por Kuracov et al. (2011), onde cepas de *P. citrinum* não foram capazes de apresentar capacidade fermentativa ou crescimento celular em condições anaeróbias.

Sob condições anaeróbias, a elevada formação de CO₂ é evidenciada como resultado da oxidação dos constituintes intermediários de seus substratos originais, como a lactose, as proteínas e os lipídeos, pelos microrganismos presentes (MADIGAN et al., 2016). Na presença de compostos reduzidos de nitrogênio, a formação de CO₂ pode ser observada como resultado da oxidação de seus constituintes na rota de degradação do ciclo do ácido cítrico. Nesta etapa, são liberadas 2 moléculas de CO₂ para cada molécula que entra no ciclo (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016). Nos lipídeos, a molécula de Acetil-CoA entra no ciclo do ácido cítrico como produto da etapa de β-oxidação; nas proteínas, os peptídeos formados na etapa de hidrólise das proteínas são convertidos a α-cetoácidos, encaminhando-se para o ciclo do ácido cítrico. Já os carboidratos, são convertidos a piruvato na etapa de glicólise, sendo, posteriormente, oxidado a Acetil-CoA e entrando no ciclo do ácido cítrico (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016).

A Figura 29 apresenta o perfil de degradação de DQO do efluente de laticínio durante os ensaios preliminares realizados.

Figura 29 - Perfil de degradação da MO, avaliada em termos de DQO, da AR de laticínio Hopelat, durante os ensaios preliminares do processo hidrolítico e metanogênico.



AR = água residuária de laticínio; Lodo = lodo granular anaeróbio; B.F = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum* e B.F.I = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum* e imobilizadas em cubos de poliuretano.

Em conformidade com a Figura 29, nos ensaios envolvendo a AR e o lodo anaeróbio, a fração de DQO foi quase totalmente removida a partir de 70 horas de

reação, apresentando eficiência de degradação da MO em torno de 88%. Valor similar, em torno de 84%, foi observado nos ensaios de DA do soro de leite, em batelada, realizados por Ibrahim (2014), em temperatura de 36°C e pH 6.5. Ferreira et al. (2021) também obtiveram valores de remoção de DQO de 76,63% para a biodegradação da AR de laticínio, à temperatura de 30°C e pH 7,0.

Para todos os ensaios contendo biomassa fúngica, pode ser observado que a concentração de DQO do meio líquido aumentou logo no início das bateladas realizadas. Em se tratando da assimilação dos nutrientes pela atividade metabólica exercidas pelos microrganismos presentes, não há razão para um aumento expressivo da concentração de DQO do meio reacional. Deste modo, possível explicação pode ser atribuída à hidrólise mediada pelas enzimas extracelulares sintetizadas ou pela desintegração da biomassa, em razão da morte celular ou MO não computada, aumentando a fração de MO disponível no meio líquido e reduzindo a eficiência de remoção de DQO.

A redução da eficiência de remoção de DQO durante a DA da AR de laticínio, quando inoculados na mesma unidade reacional células íntegras do fungo filamentososo *Penicillium citrinum* e lodo anaeróbico, também, foi observada por Ferreira et al. (2021). Tais valores de eficiência de remoção de DQO foram de 76,6% para a condição de controle para menos que 58% nas condições experimentais testadas envolvendo o tratamento híbrido.

Em relação ao desempenho apresentado pelo ensaio contendo somente biomassa fúngica e AR de laticínio, a concentração de DQO foi aproximadamente a mesma que a constatada no início do processo de tratamento, característico do processo hidrolítico/fermentativo. Devido a isso, análises dos perfis de degradação dos principais constituintes da AR, podem trazer melhores informações sobre o efeito do emprego de células íntegras no tratamento híbrido de AR com elevado teor de lipídeos.

A Figura 30 apresenta o perfil de glicerol, proteínas, teor de acidez e carboidratos totais, tanto para os ensaios envolvendo a AR e lodo anaeróbico, como nos ensaios envolvendo a AR e o emprego de células íntegras livres do fungo filamentososo *P. citrinum*. De forma análoga, a Figura 31 apresenta os perfis mediante a execução dos ensaios envolvendo a utilização de AR, lodo anaeróbico e células íntegras livres (Figura 31.a) e imobilizadas (Figura 31.b) do fungo filamentososo *P. citrinum*.

Figura 30 – Perfil de glicérol, proteína, carboidratos totais e teor de acidez para os ensaios contendo (a) AR e lodo anaeróbico e (b) AR e células íntegras livres do fungo filamentososo *P. citrinum*.

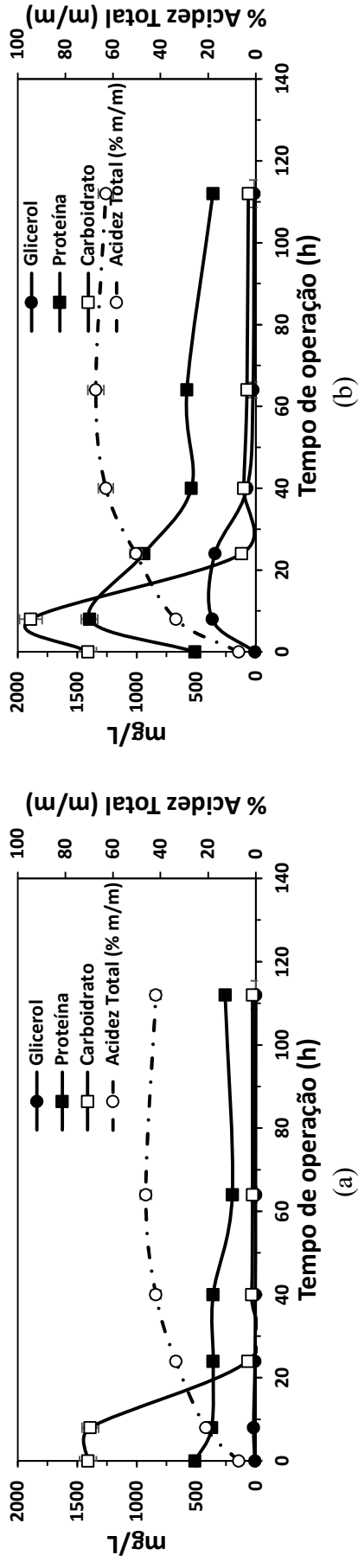
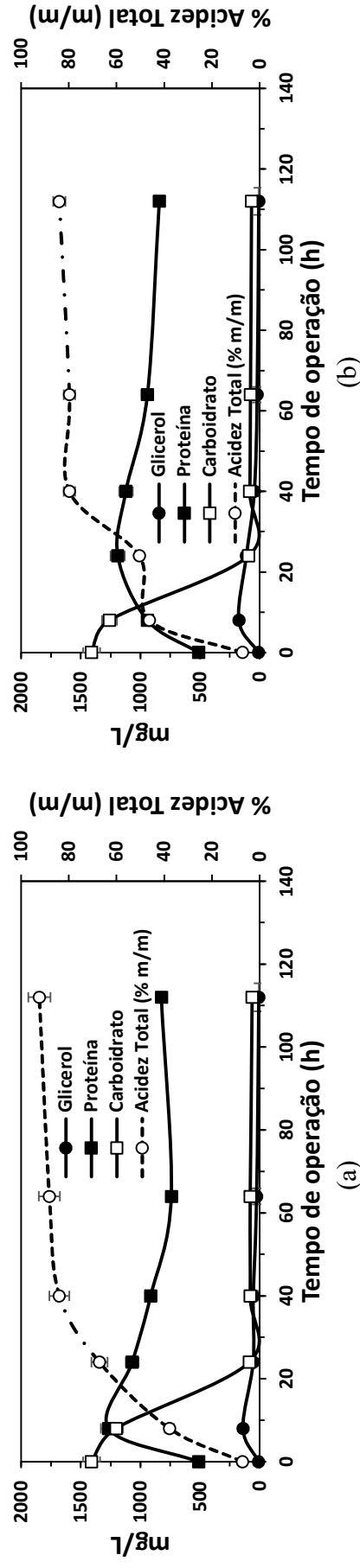


Figura 31 – Perfil de glicérol, proteína, carboidratos totais e teor de acidez para os ensaios contendo (a) AR, lodo anaeróbico e células íntegras livres do fungo filamentososo *P. citrinum* e (b) AR, lodo anaeróbico e células íntegras imobilizadas do fungo filamentososo *P. citrinum*.



Em função do aumento da concentração e solubilização dos principais componentes da AR de laticínio, pode-se observar que a etapa de hidrólise foi mais acentuada nos ensaios contendo biomassa fúngica do que em comparação com os ensaios contendo apenas AR diluída e lodo anaeróbio, corroborando os objetivos deste trabalho (Figura 30 e Figura 31). A etapa de hidrólise se faz necessária para a conversão dos carboidratos, proteínas e lipídeos em açúcares, aminoácidos e AGCL, respectivamente, uma vez que os micróbios são incapazes de assimilar MO complexa, o que requer a transformação prévia em partículas solúveis simples através da ação de enzimas (LI; PARK; ZHU, 2011; ZEHNDER; GUJER, 1983).

Ao comparar o perfil de degradação dos lipídeos nos ensaios contendo biomassa fúngica com os ensaios livres de sua presença, observa-se aumento do perfil de glicerol e ácidos orgânicos nas primeiras 20 horas de reação. Tanto o glicerol como os ácidos graxos são produtos da hidrólise de triacilgliceróis, forma predominante dos lipídeos presentes nas ARs da indústria de laticínios (QUÉMÉNUER; MARTY, 1994). O teor de acidez dos ensaios contendo células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum* (Figura 30.b e Figura 31) foram maiores comparados com o ensaio contendo apenas biomassa anaeróbia granular e AR de laticínio (Figura 30.a), evidenciando a possível inibição da etapa de metanogênese pela formação de acúmulo de elevadas concentrações de AGCL e outros intermediários do processo de fermentação.

Utilizando lipases de *Penicillium restrictum* e fonte de substrato apresentando três diferentes concentrações de lipídeos (200, 600 e 1000 mg/L), Leal et al. (2006) relataram que a produção de ácidos graxos aumentou quase linearmente nas primeiras 12 horas de hidrólise do soro de leite. Ainda segundo os autores, após as primeiras 12 horas de reação, os testes conduzidos em temperatura de 45°C produziram ácidos graxos livres de forma mais rápida, fato não observado nos experimentos conduzidos em temperaturas de 25 e 35°C. Cammarota, Texeira e Freire (2001) relatam o decaimento da concentração de ácidos graxos livres após 24 horas de reação de hidrólise, empregando enzimas lipolíticas de *Penicillium restrictum*. Segundo os autores, este fato está diretamente relacionado com o consumo de ácidos graxos livres por microrganismos aeróbios presentes no meio reacional.

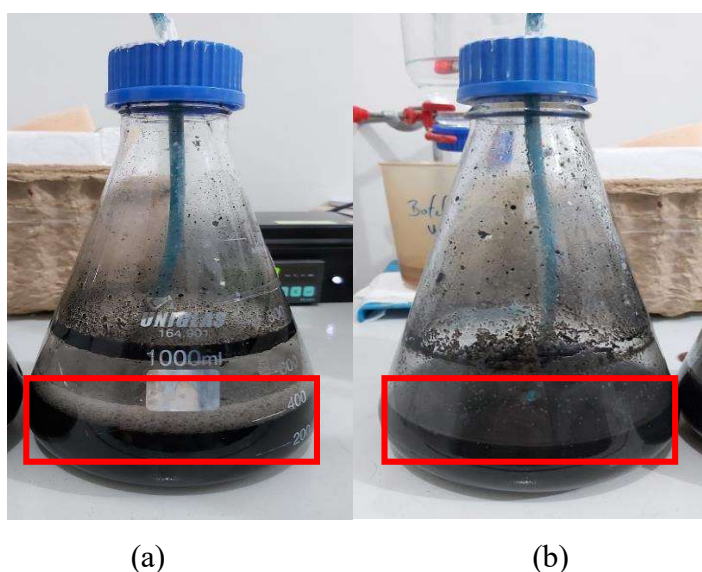
Em todos os ensaios realizados, a fração de carboidratos foi rapidamente oxidada dentro das primeiras 20 horas de reação. Tal comportamento se dá pela boa e rápida assimilação pelos microrganismos, como as bactérias acidogênicas, que

transformam a lactose em etanol, ácido propiônico, dióxido de carbono e água (BELLA; RAO, 2021). A fração de carboidratos, principalmente na forma de lactose, pode contribuir em até 90% dos valores de DQO observados para as ARs de laticínios (WANG et al., 2009).

No estudo realizado por Manetti (2012), os carboidratos da AR de laticínio representam, aproximadamente, 51% da DQO deste tipo de AR. Ainda segundo o autor, os principais carboidratos presentes na AR de laticínio são a lactose (10,1%), sacarose (8,6%), glicose (7,9%), frutose (7,8%), maltose (5,7%) e outros (59,9%). Entretanto, a alta concentração de lactose rapidamente fermentável pode resultar na inibição dos microrganismos metanogênicos, principalmente devido à baixa alcalinidade apresentada pelo efluente da indústria de laticínio (SLAVOV, 2017).

Durante a realização dos ensaios preliminares, pode-se notar diferença no aspecto visual no meio reacional líquido para os ensaios envolvendo a presença de biomassa fúngica em comparação com os ensaios contendo apenas AR diluída e lodo anaeróbio. Os ensaios contendo AR diluída e lodo anaeróbio ficaram evidenciados pela presença de uma camada de espuma na superfície do meio líquido, conforme mostra a Figura 32.

Figura 32 - (a) Camada de espuma presente no meio reacional contendo efluente de laticínio e lodo anaeróbio; (b) não evidência de camada de espuma presente nos ensaios contendo células íntegras de fungos filamentosos.



Segundo Salminen e Rintala (2002), a formação de espuma no meio reacional está diretamente relacionada com o acúmulo de ácidos graxos não biodegradados no

tratamento deste tipo de efluente.

Ao término desta etapa, pode-se destacar, de forma preliminar, que o emprego de células íntegras no pré-tratamento de AR contendo elevados teores de gorduras, se aplicado de forma correta e sob condições adequadas, apresentam potencial para trazer benefícios para o processo de DA em reatores. Estudos visando a determinação das condições operacionais adequadas para o processo de hidrólise com fungos filamentosos e para o processo de DA, empregando AR da indústria de laticínio, são fatores fundamentais para o propósito desta pesquisa.

6.5. Influência da ausência de oxigênio molecular na hidrólise enzimática da AR de laticínio utilizando células íntegras de fungos filamentosos de *Penicillium citrinum*.

Na Etapa 4, mediante o emprego de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* e com o objetivo de avaliar os efeitos da ausência de oxigênio molecular na hidrólise da AR diluída de laticínio (fator de 10), ensaios em batelada foram conduzidos sob anaerobiose e condição de microaeração.

A fim de obter um sistema anaeróbico, a Figura 33 demonstra o preparo dos reatores bateladas e a adição de corrente de gás inerte no reator contendo biomassa fúngica e AR.

Figura 33 – (a) AR e biomassa fúngica e (b) preparo do sistema para obtenção de um sistema anaeróbico.



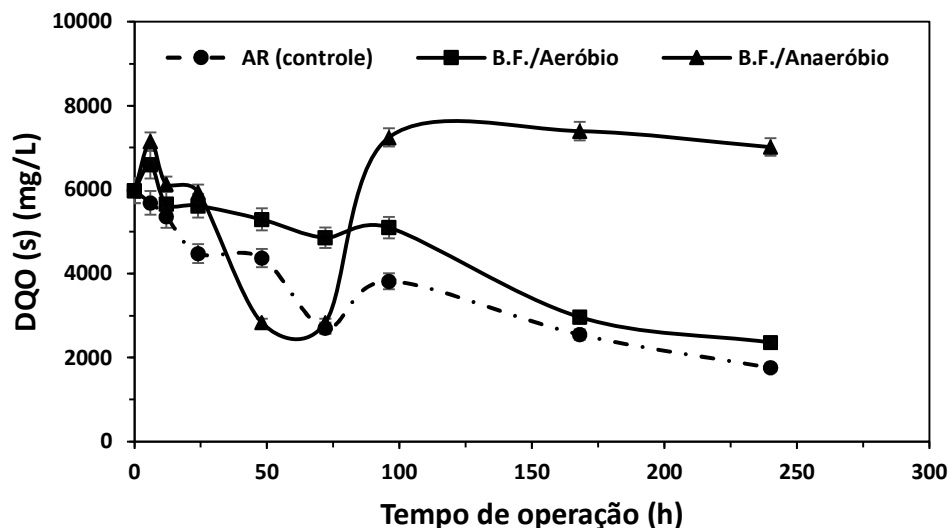
(a)

(b)

A Figura 34 apresenta o perfil de remoção de Demanda Química de Oxigênio

solúvel (DQOs) da AR de laticínio, ao final de 240 horas de ensaio, utilizando células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum* como inóculo.

Figura 34 - Remoção de DQO solúvel da AR diluída de laticínio.



AR = água residuária de laticínio (reator autoinoculado - controle); B.F. = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum*.

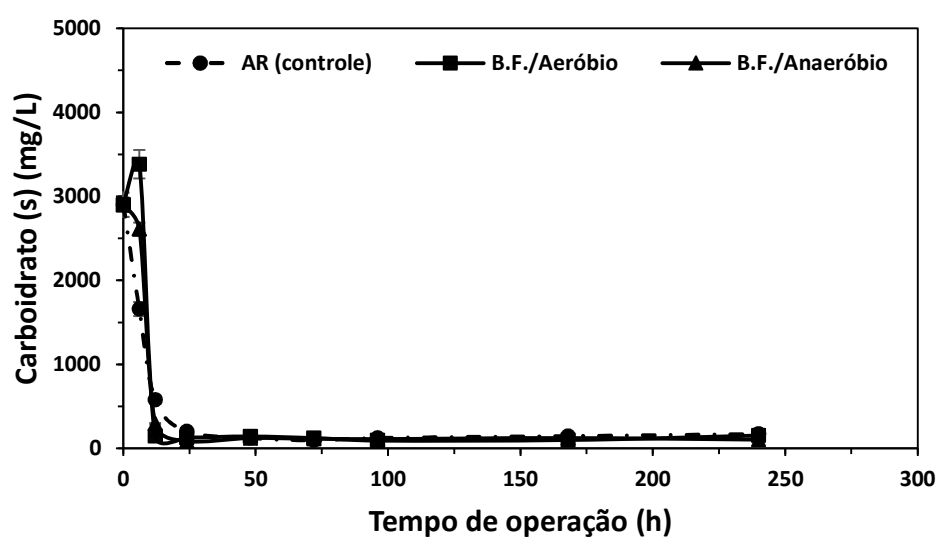
De acordo com a Figura 34, a condição do reator controle, ao qual não foi inoculada biomassa, contendo apenas os microrganismos autoinoculados na AR utilizada, foi o que apresentou a maior porcentagem de remoção de DQOs. Tal porcentagem de remoção total foi de 70,58%, em 240 horas de ensaio. O reator inoculado com biomassa fúngica, sob condições microaeradas, obteve perfil de degradação de MO próximo ao apresentado pelo reator controle, sendo constatado porcentagem de remoção de DQOs final de 60,46%.

Células íntegras livres de fungo filamentososo *P. citrinum* foram inoculadas sob anaerobiose e sem remoção de DQOs expressiva ao final das 240 horas de operação. Nessa condição, foi obtido aumento da DQOs de 14,64% ao final do ensaio. Entretanto, observa-se que dentre as três condições analisadas, nas primeiras 48 horas de ensaio, o perfil de remoção de DQOs apresentado pela utilização de biomassa fúngica sob condição anaeróbia foi o maior, 52,51%, seguidos de 26,82% para o reator controle e 11,44% mediante a utilização de biomassa fúngica sob aerobiose. Tal fato observado pela presença de células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum* em condições anaeróbias, leva a alternância entre o perfil conversor (hidrolítico) e o perfil degradador

(consumidor), nas condições do ensaio. O aumento significativo de DQOs após as primeiras 48 horas de ensaio, pode ser explicado pela maior solubilização de elementos da biomassa inoculada, interferindo na análise de remoção de DQO da AR, utilizada como fonte de substrato.

Em relação aos principais constituintes da AR, destacando-se os carboidratos, proteínas e lipídeos, as Figuras 35 a 37 mostram, respectivamente, os perfis de conversão para as três condições testadas.

Figura 35 - Perfis de conversão de carboidratos solúveis da AR diluída.



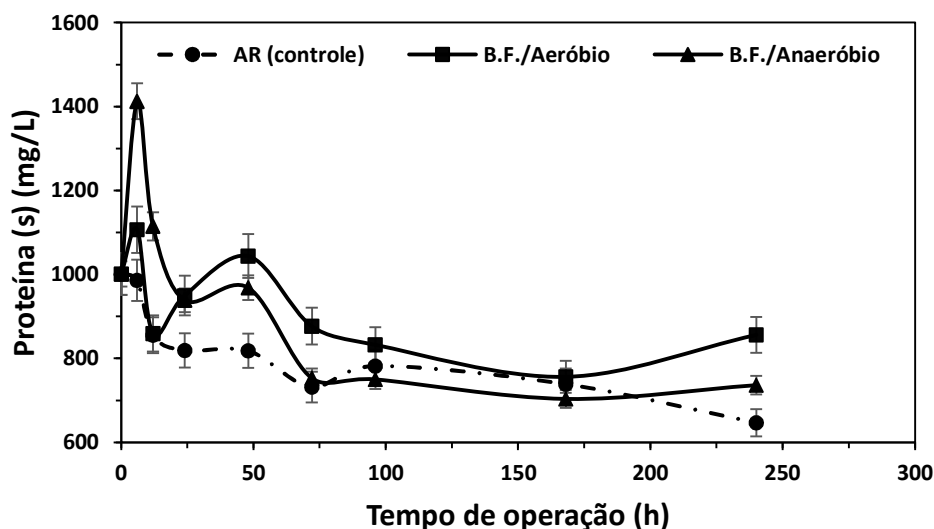
AR = água residuária de laticínio (reator autoinoculado - controle); B.F. = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*.

A rápida fermentação dos carboidratos presentes na AR de laticínio é observada pela Figura 35. Em todas as condições analisadas, quase todo carboidrato é convertido nas primeiras 12 horas de operação, sendo, também, observada grande similaridade dos perfis apresentados ao longo das 240 horas. Tais perfis corroboram os resultados de Perle, Kimchie e Shelef (1995), Vidal et al. (2000), Santos (2015) e Fernandes (2016). Neste contexto, a rápida fermentação dos carboidratos, principalmente a lactose, está diretamente relacionada com o consumo deste tipo de substrato e formação de ácidos orgânicos pelos microrganismos acidogênicos (GHALY, 1996; SLAVOV, 2017).

Uma vez que elevadas taxas de produção de ácidos orgânicos contribuem para a acidificação do sistema e visando a posterior utilização da AR de laticínio em reatores anaeróbios metanogênicos, um eficiente controle de pH do meio deve ser implementado. A acidificação é observada pelo acúmulo de ácidos orgânicos em função das diferenças

nas taxas de acidogênese e metanogênese, podendo ser inibitório para a produção de metano (GLOBOS et al., 2008; VON SPERLING, 1998). Assim, a estabilização do pH pode ser alcançada pela suplementação de alcalinizante, evidenciado pelo uso do bicarbonato de sódio (NaHCO_3).

Figura 36 - Perfis de conversão de proteínas solúveis da AR diluída.



AR = água residuária de laticínio (reator autoinoculado - controle); B.F. = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*.

Considerando que parcela de soro de leite gerado no processamento do leite, em laticínios, contribui majoritariamente para composição da AR deste tipo de segmento industrial, segundo Haraguchi, Abreu e Paula (2006), as principais proteínas encontradas no soro de leite são a alfa-lactoalbumina (ALA), beta-lactoglobulina (BLG), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glico-macropéptidos (GMP). Ainda segundo os autores, no leite bovino podem ser encontrados 80% de caseína e 20% das proteínas do soro. Grande similaridade entres os perfis de conversão de proteínas presentes na AR de laticínio (Figura 36), também, foram evidenciadas para as condições avaliadas na Etapa 4. Observa-se que ao final de 240 horas de ensaio, em média, foram convertidos cerca de 30% das proteínas totais analisadas no início da operação dos reatores em batelada. A difícil conversão e degradação das proteínas pode ser atribuída a sua estabilidade estrutural, em função de sua estrutura globular contendo pontes de dissulfeto (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

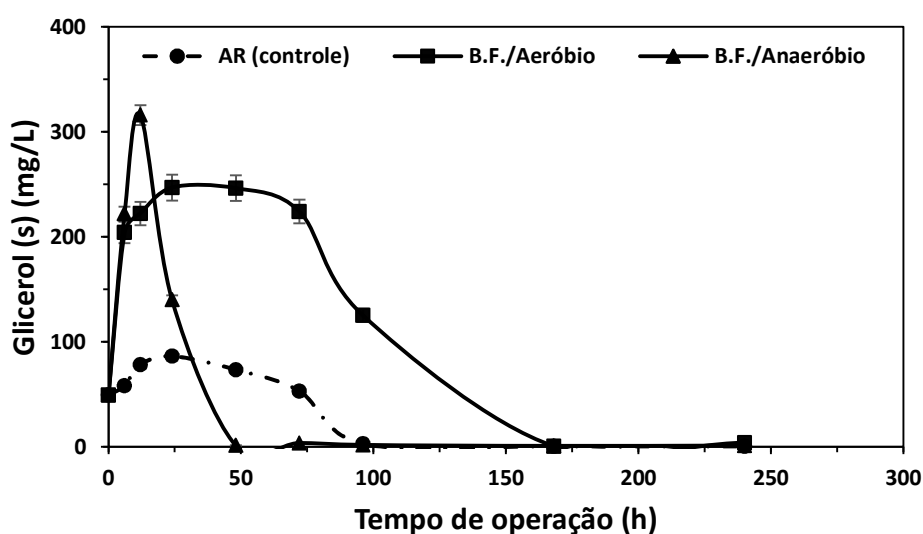
Com o emprego de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, principalmente sob condições anaeróbias e assim como no perfil de remoção de DQOs,

nas primeiras horas de operação, verifica-se a alternância entre o incremento e decaimento das proteínas solúveis no meio reacional, possivelmente causados pela hidrólise de frações insolúveis no sistema, seguido da conversão em intermediários do processo de degradação. Na hidrólise e fermentação de proteínas sobre condições ácidas (pH 5,0) e metanogênicas (pH 7,0), a velocidade de hidrólise é cinco vezes maior que a fermentação dos produtos da hidrólise, indicando a acidificação como limitante da velocidade de degradação anaeróbia das proteínas dissolvidas (DUONG et al., 2019). Entretanto, a hidrólise das proteínas ocorre em uma taxa menor que a hidrólise dos carboidratos (PAVLOSTATHIS; GIRALDO-GOMEZ, 1991, VIDAL et al., 2000).

A proteína do leite é associada como a principal fonte de nitrogênio na AR de laticínio. No efluente de laticínio, os compostos de nitrogênio estão presentes 40% como NH_3 e 60% como nitrogênio orgânico. Juntamente com os compostos fosfatados, estes formam os principais tipos de nutrientes presentes na AR de produtos lácteos (GUILLEN-JIMENEZ et al., 2000; KARADAG et al., 2015). Segundo Guillen-Jimenez et al. (2000), o fósforo é encontrado na AR de laticínio na sua forma inorgânica como polifosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) e ortofosfatos (PO_4^{3-}).

Reforçando a ideia de alternância entre o perfil conversor (hidrolítico) e degradador da biomassa fúngica cultivada, os perfis de consumo e formação de glicerol são mostrados na Figura 37.

Figura 37 - Perfis de formação e consumo de glicerol solúvel da AR diluída.



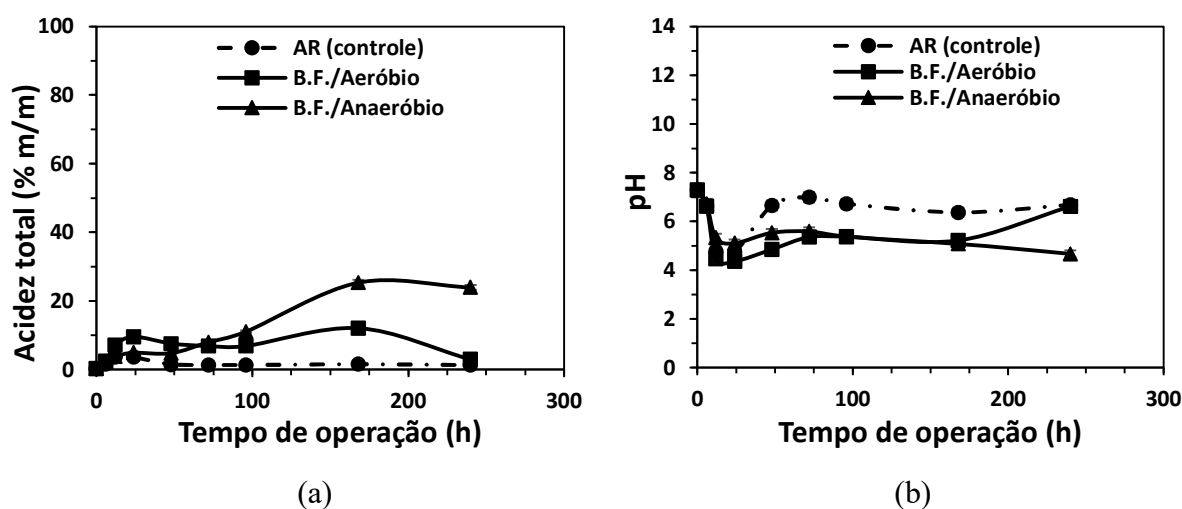
AR = água residuária de laticínio (reator autoinoculado - controle); B.F. = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum*.

Uma vez que o glicerol e os AGCL são formados pela hidrólise das frações de lipídeos presentes na AR de laticínio e de acordo com a Figura 37, observa-se que no emprego de células íntegras de fungos filamentosos, em anaerobiose, a maior formação de glicerol foi alcançada nas primeiras 12 horas de operação. Ambas as demais condições tiveram porcentagem de formação máxima de glicerol em 24 horas de ensaio.

O glicerol é um composto orgânico de função alcoólica, com elevado poder energético, fácil degradação pelos microrganismos anaeróbios/aeróbios e com baixa necessidade de nutrientes, economia de energia e geração mínima de lodo (HUTNAN et al., 2013; METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998). Em função de seu ótimo rendimento de degradação, chegando a 98% em metano, várias pesquisas vêm utilizando a suplementação de glicerol ao sistema para a co-digestão de vários tipos de ARs (ASTALS et al., 2013; ATHANASOULIA et al., 2014; AYABE, 2018; BORGES, 2020; GARCIA, 2019; SERRANO et al., 2014; TAKEDA, 2021).

Como o consumo do glicerol é rápido, a avaliação de sua formação como parâmetro principal do monitoramento do processo hidrolítico, dos lipídeos presentes na AR de laticínio, é dificultada, o que requer outros parâmetros de monitoramento complementares, tais como a avaliação das frações de lipídeos via análise cromatográfica e determinação da acidez total do sistema. Assim, a Figura 38.a evidencia o perfil de acidez total do meio em função dos ácidos orgânicos formados e a Figura 38.b apresenta o perfil do pH do meio, ao longo dos ensaios.

Figura 38 – Perfil de (a) acidez total e (b) pH do meio racional em função do tempo de operação dos ensaios.



AR = água residuária de laticínio (reator autoinoculado - controle); B.F. = biomassa fúngica composta por células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*.

É possível observar que a utilização de células íntegras livres do fungo filamentosso *P. citrinum*, em condições anaeróbias, apresentaram a maior porcentagem de acidez do meio (23,94%) (Figura 38.a), acompanhada de queda do pH (Figura 38.b), o que corrobora com os objetivos deste trabalho, mediante a realização da hidrólise e fase ácida no pré-tratamento da AR de laticínio. O teor de acidez total medido está diretamente associado com os ácidos graxos e ácidos orgânicos formados como produto da hidrólise e intermediários da fermentação, respectivamente, das proteínas, carboidratos e lipídeos (BELLA; RAO, 2021; METCALF; EDDY, 2016).

De acordo com a Figura 38.b, verifica-se que nas primeiras 24 horas de operação, todas as condições analisadas apresentaram queda significativa do pH do meio, acidificando parcialmente o sistema. Tal fato pode ser consequência das altas taxas de conversão dos carboidratos (Figura 35), proteínas (Figura 36) e lipídeos (Figura 37) em ácidos, logo no início das bateladas. Uma vez que a AR bruta de laticínio apresenta baixa alcalinidade, elevadas concentrações de ácidos orgânicos resultam na acidificação do meio reacional, o que requer a suplementação de compostos alcalinizantes para o tamponamento do sistema e o desenvolvimento da etapa de metanogênese, sob cargas de choque, em reator anaeróbio (METCALF, EDDY, 2016; SLAVOV, 2017).

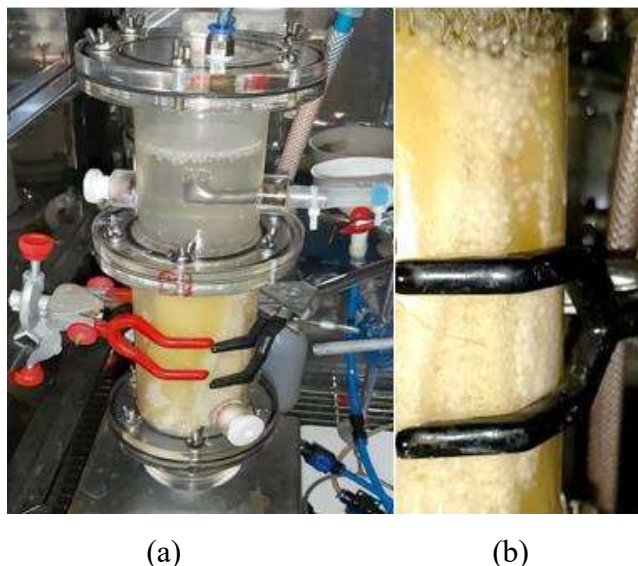
Objetivando a redução de TDH para o tratamento biológico da AR de laticínio e em virtude dos dados apresentados pelas Etapas 3 e 4 (bateladas), parâmetros operacionais foram selecionados para a operação dos reatores hidrolíticos e metanogênicos, alimentados continuamente. Destaca-se que a aplicação das células íntegras de *P. citrinum* em condições próximas às requeridas pela metanogênese (anaerobiose) são fundamentais e podem trazer benefícios ao processo de DA convencional, quando aplicados de forma sequencial.

6.6. Hidrólise enzimática em reator contínuo de fluxo ascendente utilizando biomassa fúngica

Na Etapa 5 da presente pesquisa, o desempenho das células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*, atuando na hidrólise da AR de laticínio, em reatores contínuos (RH), foi avaliado quanto à influência da imobilização celular, concentração enzimática inoculada e disponibilidade de oxigênio molecular. Todos os reatores receberam introdução de ar, carreando oxigênio, conjuntamente com a AR de laticínio,

pela bomba de alimentação, entretanto, duas configurações de *headspace* foram testadas, reator de topo aberto e de topo fechado. Os reatores contínuos foram operados com TDH teórico de 12 horas, conforme mostra a Figura 39.

Figura 39 – (a) Operação de reator contínuo hidrolítico/fermentativo de leito estruturado contendo (b) destaque das células íntegras imobilizadas em tiras de espuma de poliuretano.



O *Apêndice B* apresenta os perfis de remoção da MO (Figura B1), monitoramento do pH (Figura B5) e bioconversão dos carboidratos (Figura B2), gliceróis (Figura B3) e proteínas (Figura B4), nos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos para as condições de controle (reator autoinoculado) e mediante inoculação de 7500U, representado pela adição de células íntegras, livres e imobilizadas, da biomassa fúngica.

Verifica-se que todas as configurações e condições avaliadas apresentaram oscilações em relação a eficiência média de remoção de MO (%) (Figura B1). A Tabela 15 apresenta os valores médios, seguidos da variância, do desempenho de remoção de DQO para os reatores hidrolíticos/fermentativos.

De acordo com a Tabela 15 e Figura B1, pode-se observar que a eficiência média de remoção de DQO foi similar em todas as condições, inferior a 20%. Tal porcentagem de remoção de DQO é similar aos valores encontrados durante a digestão ácida, em sistemas anaeróbios, por bactérias hidrolíticas e fermentativas, incluindo-se, também, as bactérias autoinoculadas do afluente. Neste aspecto, a degradação da MO é baixa, havendo apenas a conversão do substrato em intermediários da fermentação

(METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998).

Tabela 15 - Eficiência média de remoção de DQO e variância dos reatores hidrolíticos/fermentativos.

Condição	Remoção média de DQO (%)	Variância (%)²
RHA1	14±7	50,7
RHA2	8±4	16,3
RH3	12±7	42,8
RH4	15±5	29,0

RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

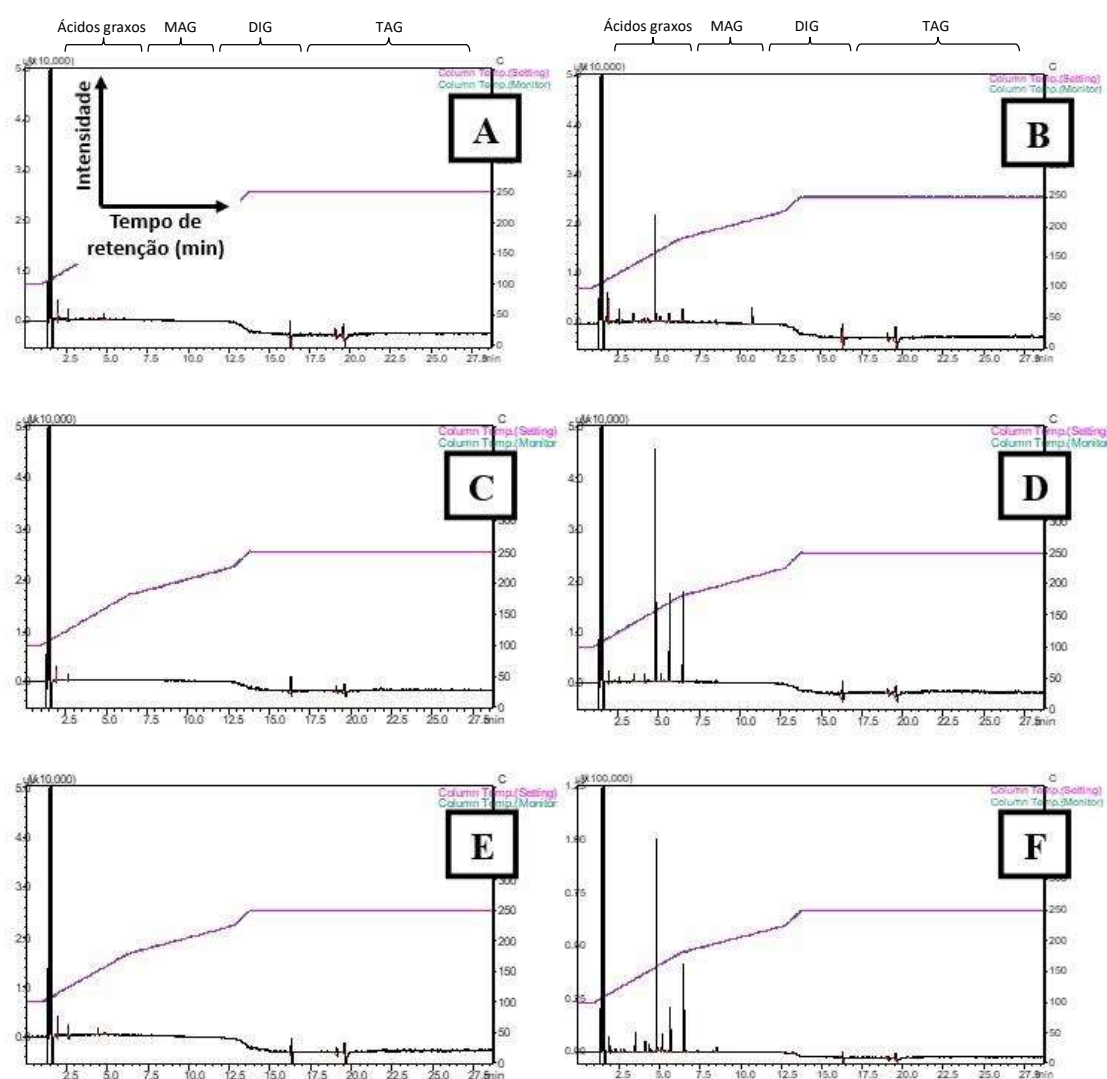
Devido ao período de interrupção das atividades laboratoriais, como consequência do início e agravamento da pandemia do COVID-19, nota-se que o tempo de armazenamento, em câmara fria, do reator controle aberto (RHA1), entre os dias 7 e 56 de operação, não causou alteração significativa de seu desempenho (Figura B1.a). Tal característica, também, é observada na repartida do reator hidrolítico/fermentativo com 7500U (RH4), pela inoculação de células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*, parado entre os dias 20 e 67 (Figura B1.d).

Em todas as condições experimentais testadas e para o valor de TDH teórico dos reatores contínuos de 12h, os carboidratos presentes na AR de laticínio foram totalmente convertidos em intermediários do processo de fermentação (Figura B2), assim como foi observado na operação em batelada (Figura 35). Fato semelhante pode ser atribuído ao glicerol (Figura B3), produto da hidrólise enzimática dos lipídeos, evidenciando a rápida formação e, posterior, bioconversão em intermediários da fermentação. Assim, os resultados indicaram que o valor de TDH de 12 horas empregado, para a operação dos reatores hidrolíticos/fermentativos, autoinoculados ou não, não foi limitante para a bioconversão dos carboidratos e lipídeos, nas condições operacionais utilizadas.

A qualidade da bioconversão das frações de lipídeos, presentes na AR de laticínio, durante a operação de fase ácida como resultado do pré-tratamento biológico realizado (TDH de 12 horas), foi confirmada pela análise cromatográfica *GC-FID*. A

Figura 40 mostra a comparação entre os cromatogramas obtidos da análise do afluente e efluente de amostras aleatórias, analisadas durante o período de operação dos reatores contínuos para as condições RHA1, RH3 e RH4.

Figura 40 – Cromatogramas obtidos via *GC-FID* evidenciando os picos das frações de lipídeos e seus respectivos tempos de retenção das amostras do reator (a) RHA1 – afluente; (b) RHA1 – efluente; (c) RH3 – afluente; (d) RH3 – efluente; (e) RH4 – afluente e (f) RH4 – efluente. Solvente extrator Clorofórmio/Metanol (2:1). Concentração de 30 mg amostra/mL de solvente Acetato de Etila.



RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

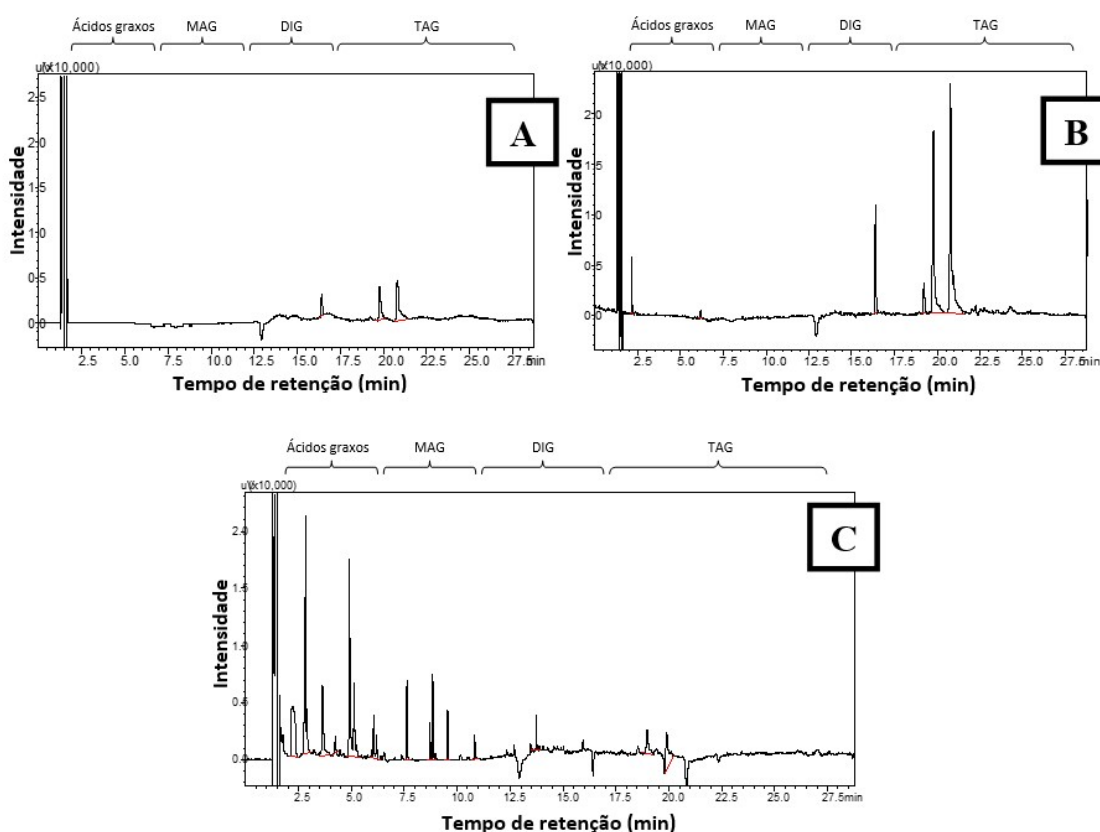
Segundo Quéménuer e Marty (1994), nas AR de laticínios, os lipídeos se encontram, preferencialmente, na forma de triacilgliceróis, apresentando pequena parte na forma de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), destacando-se a maior

concentração dos ácidos palmítico, esteárico, oleico e linoleico.

Mediante o emprego de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, como biomassa fúngica inoculada nos reatores hidrolíticos de fase ácida, verifica-se a maior diversidade e intensidade dos picos de analitos nas frações de lipídeos bioconvertidos em ácidos graxos (tempo de retenção entre 2,0 e 7,0 minutos de corrida cromatográfica) para a corrente efluente, sob mesma concentração de amostra injetada (Figura 40.d e Figura 40.f). Tais resultados evidenciam o potencial de hidrólise enzimática e bioconversão dos lipídeos presentes na AR de laticínio pelas células íntegras do fungo filamentoso utilizado.

Durante a operação do reator RH4, foi monitorado o perfil apresentado pelas frações de lipídeos no afluente, em metade do volume útil de trabalho (0,5 litros) do reator e no efluente obtido. A Figura 41 apresenta os cromatogramas obtidos para as condições mencionadas.

Figura 41 – Cromatogramas obtidos via *GC-FID* evidenciando os picos das frações de lipídeos e seus respectivos tempos de retenção das amostras do reator RH4 no (a) afluente; (b) em metade do volume útil de trabalho do reator e (c) no efluente pré-tratado. Solvente extrator Clorofórmio/Metanol (2:1). Concentração de 30 mg amostra/mL de solvente Acetato de Etila.



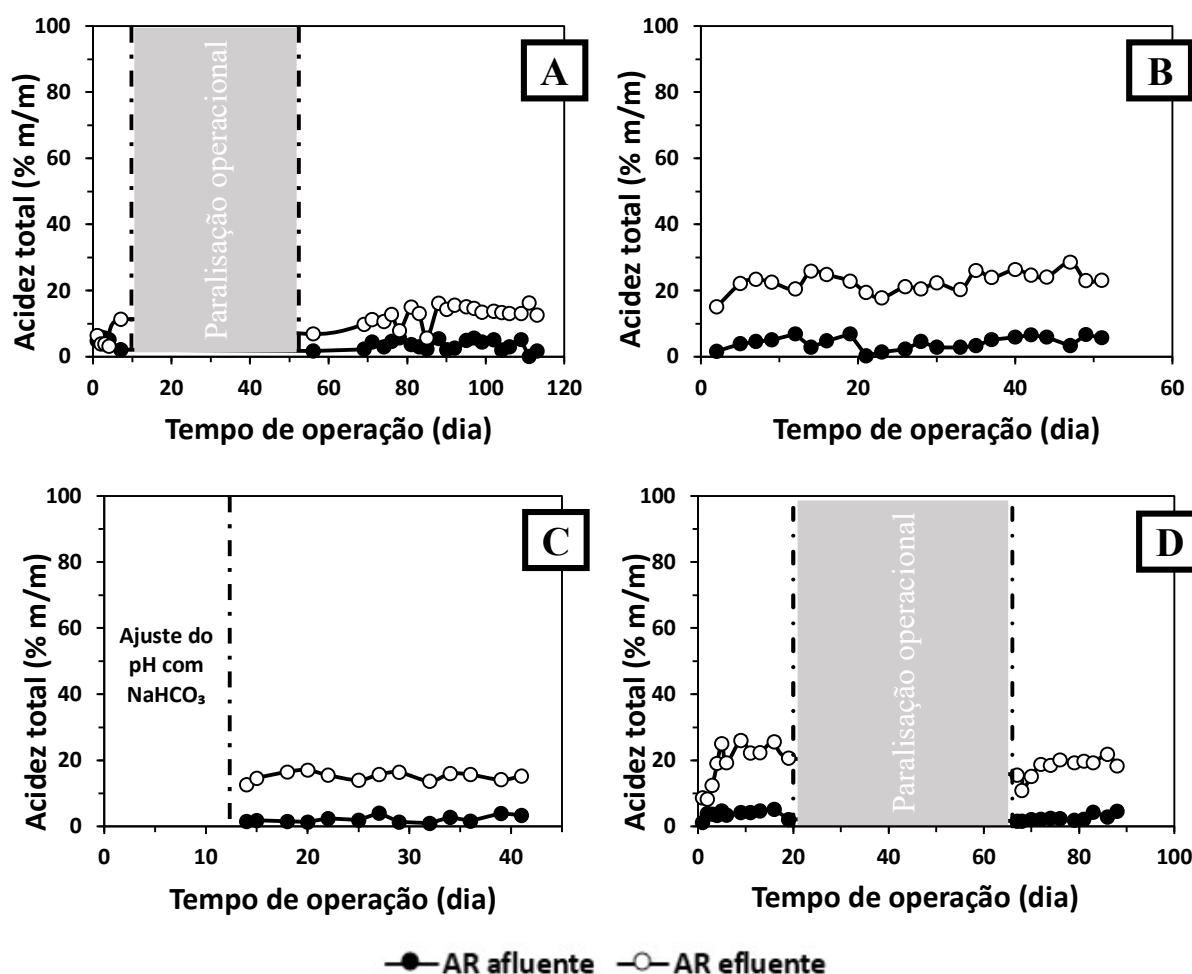
RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

De acordo com a Figura 41, quando comparados com os sinais apresentados pelos analitos identificados na corrente afluyente da AR de laticínios (Figura 41.a), em metade do volume útil do reator hidrolítico RH4 (Figura 41.b), foram obtidos aumentos das frações solúveis de triglicerídeos (TAG) e diglicerídeos (DIG) no meio líquido. Também, foi observado a separação de analito com tempo de retenção próximo ao do solvente (2,1 minutos), possivelmente estando este relacionado à formação de glicerol como produto da hidrólise dos lipídeos (ROSSET, 2011). Ao final do TDH empregado de 12 horas (efluente), as frações de TAG e DIG foram, então, bioconvertidas em frações de cadeia menores, tais como MAG e ácidos graxos, o qual é possível visualizar pelo aumento da diversidade e intensidade dos sinais apresentados pelos analitos identificados no cromatograma (Figura 41.c).

A oxidação e bioconversão das proteínas totais apresentaram conversões inferiores a 30% para todas as condições estudadas (Figura B4). Tais perfis, também, se assemelharam aos perfis apresentados pela operação em batelada, empregando células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum* (Figura 36). O aumento do tempo de retenção celular da biomassa fúngica no interior do reator RH4 (Figura B4.d), provocado pela imobilização das células íntegras em tiras de espuma de PU, não induziu ao aumento das taxas de bioconversão das proteínas.

Uma vez que os principais constituintes da AR de laticínio (carboidratos, lipídeos e proteínas) foram convertidos em ácidos orgânicos como intermediários do processo de fermentação (METCALF; EDDY, 2016), o perfil apresentado pelo teor de acidez demonstra o desenvolvimento da fase hidrolítica e ácida nos reatores contínuos operados, conforme apresentado pela Figura 42.

Figura 42 – Perfis de acidez total (%) durante a operação do reator (a) RHA1; (b) RHA2; (c) RH3 e (d) RH4.



RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

Em relação a operação dos reatores RHA1 e RHA2, destaca-se a maior porcentagem de acidez total alcançada para a configuração de *headspace* fechado para a atmosfera (Figura 42.b). A configuração de topo fechado, também, influenciou no desempenho em porcentagem de acidez total dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum*. De acordo com a Figura 42.c e 42.d, pode-se observar maior porcentagem de acidez total para a configuração de topo fechado (RH4). Devido à presença de *headspace* fechado, tal configuração permite a maior retenção do CO₂ no topo do reator, influenciando no aumento do teor de acidez e queda do pH do meio (Figura B5).

A Tabela 16 apresenta os valores médios do teor de acidez total afluente e efluente, além do aumento percentual da diferença entre o valor médio apresentado pelo efluente em comparação com o afluente, durante a operação dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos.

Tabela 16 - Teor de acidez total (%) afluente e efluente para as condições testadas na operação dos reatores hidrolíticos/fermentativos.

Condição	Teor de acidez total afluente médio (%)	Teor de acidez total efluente médio (%)	Aumento percentual aflu/eflu (%)
RHA1	4±2	11±4	203
RHA2	4±2	23±3	438
RH3	2±1	15±1	591
RH4	3±1	19±5	497

RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

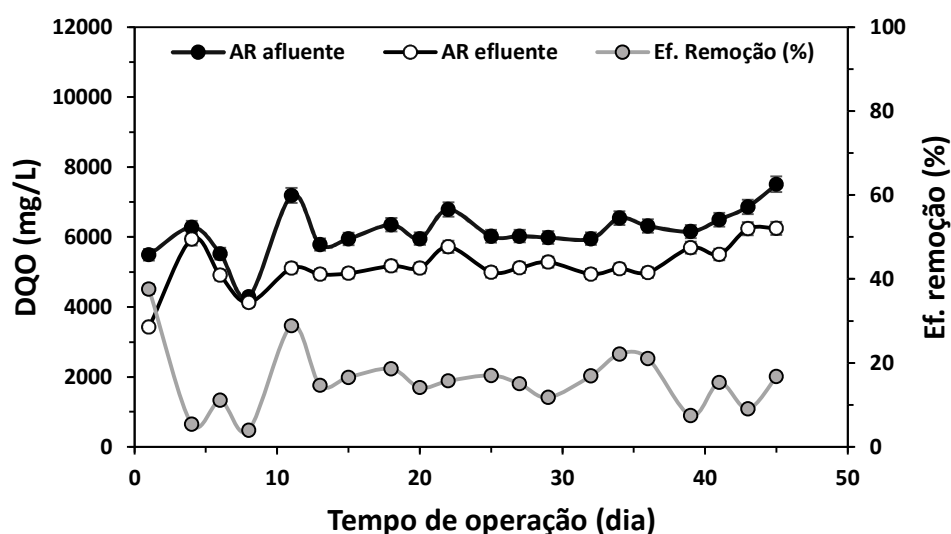
De acordo com a Tabela 16, evidencia-se que a utilização de biomassa fúngica, mediante a inoculação de células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum*, induziram a maiores aumentos percentuais do teor de acidez (%), quando comparados os valores de efluente com o de afluente.

A Figura B5 apresenta os perfis de pH dos reatores de fase ácida. Como o ajuste de pH afluente, nesta etapa, foi realizado pela adição de solução de NaOH 50%, verifica-se que os efluentes dos reatores, em todas as condições analisadas, apresentaram caráter ácido. Tal resultado se deve à conversão dos carboidratos, proteínas e lipídeos, presentes na AR de laticínio, em ácidos orgânicos durante a fase ácida e insuficiência de alcalinidade no meio líquido. Devido ao ajuste inicial do pH afluente com bicarbonato de sódio (agente tampão), a análise do teor de acidez total não foi possível de ser realizada durante os 12 primeiros dias de operação do reator RH3 por meio de adição de células íntegras livres do fungo filamentosso *P. citrinum* (Figura B5.c).

Em virtude da maior formação de ácidos orgânicos durante a fase ácida e aumento do tempo de retenção celular (TRC), como consequência do processo de

imobilização celular, a condição de operação do reator contínuo hidrolítico/fermentativo com topo fechado foi utilizada para o desenvolvimento da etapa de avaliação da influência de concentração enzimática no processo hidrolítico/fermentativo da AR de laticínio. A Figura 43 apresenta o perfil de remoção de DQO para o reator hidrolítico/fermentativo inoculado com 22500 U (RH5), concentração três vezes maior que a condição anterior (7500U/volume de reator).

Figura 43 – Perfil do reator RH5 mediante o emprego de células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum*.

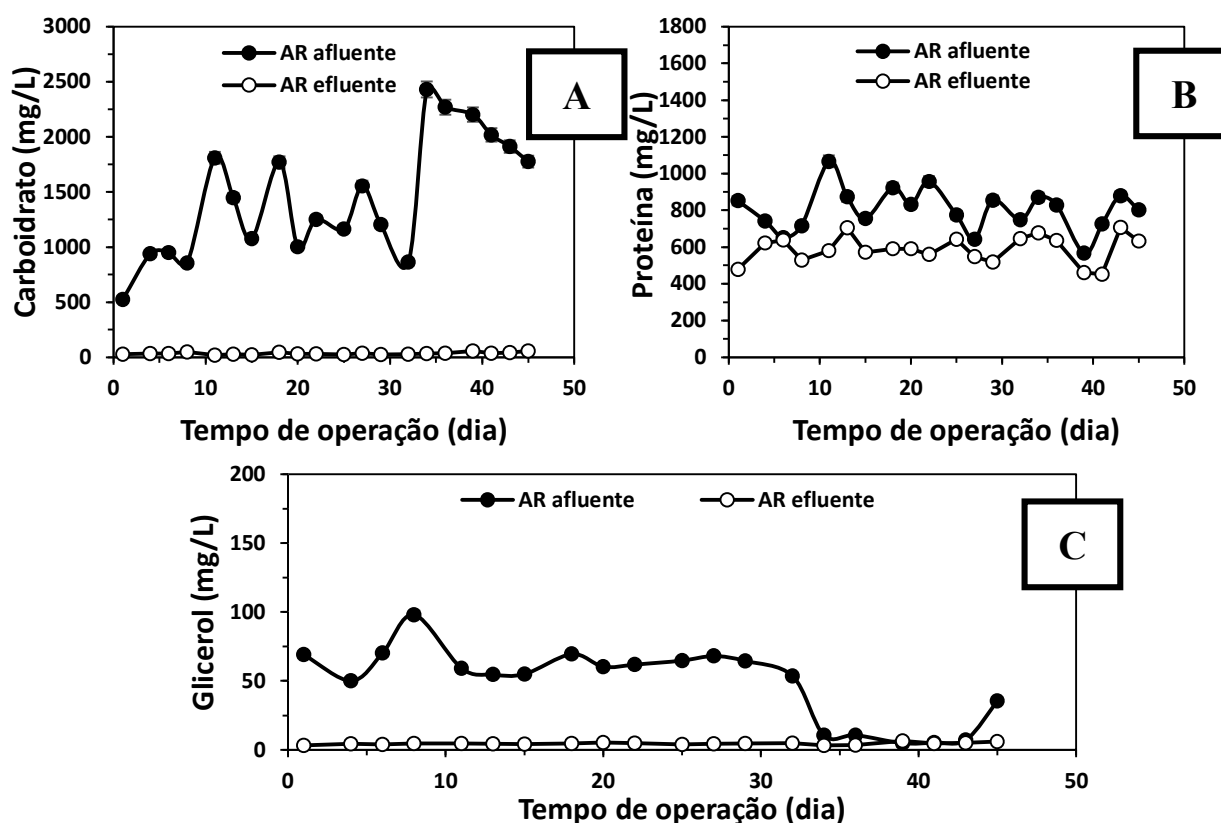


RH5 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 22500U.

De acordo com a Figura 43, a porcentagem de remoção de DQO não foi influenciada pela maior concentração de enzimas hidrolíticas, inicialmente, inoculadas no sistema. Nesta condição, para os 45 dias de operação do reator, foi obtida porcentagem de remoção de DQO média de 15,95%, somente 1,09% superior ao apresentado pela inoculação inicial de 7500 U (RH4), em 46 dias efetivos de operação.

Em função da biomassa fúngica inoculada e os microrganismos autoinoculados no afluente, a baixa remoção de DQO era esperada. No entanto, a análise dos constituintes da AR podem mostrar a influência da concentração enzimática na cinética reacional (velocidade de reação). A Figura 44 apresenta os perfis de conversão de carboidratos, proteínas e glicerol, para 22500 U inoculadas no reator RH5.

Figura 44 – Perfil de (a) carboidratos, (b) proteínas e (c) glicerol do reator RH5.

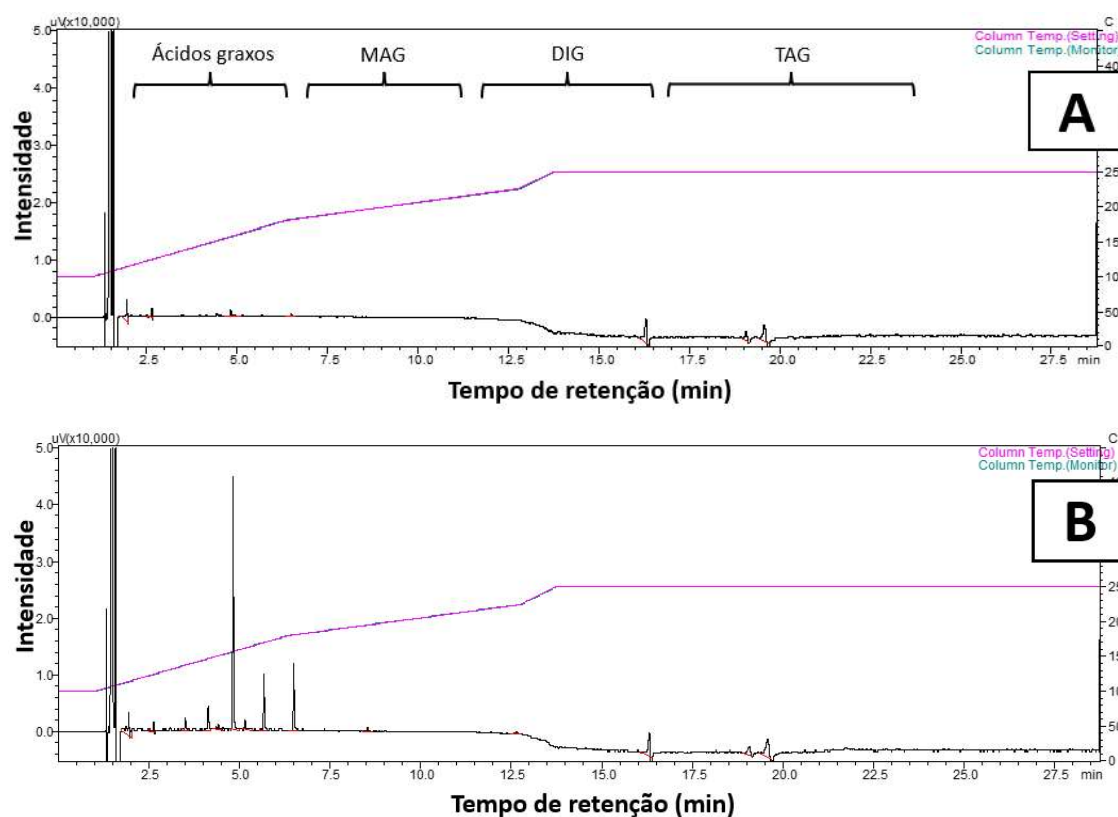


RH5 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 22500U.

Observa-se que os carboidratos e gliceróis foram rapidamente convertidos, independente do aumento da concentração de enzimas hidrolíticas inoculadas (RH4 e RH5). As proteínas não apresentaram aumento significativo de conversão em função da concentração de enzimas no meio e TDH de operação. Em todos os casos analisados (RHA1, RHA2, RH3, RH4 e RH5), há grande similaridade entre os perfis dos carboidratos, proteínas e gliceróis presentes na AR de laticínio, em função da atividade metabólica dos microrganismos associados. A fim de evidenciar e fornecer melhores informações a respeito dos processos ocorridos, a realização da caracterização da comunidade microbiana se torna ferramenta necessária (item 6.8).

A Figura 45 mostra a análise qualitativa, via *GC-FID*, das frações de lipídeos de amostras aleatórias da AR de laticínio, anterior e posterior TDH de operação do reator RH5.

Figura 45 – Cromatogramas obtidos via *GC-FID* evidenciando os picos das frações de lipídeos e seus respectivos tempos de retenção das amostras do reator (a) RH5 – afluente; (b) RH5 – efluente. Solvente extrator Clorofórmio/Metanol (2:1). Concentração de 30 mg amostra/mL de solvente Acetato de Etila.

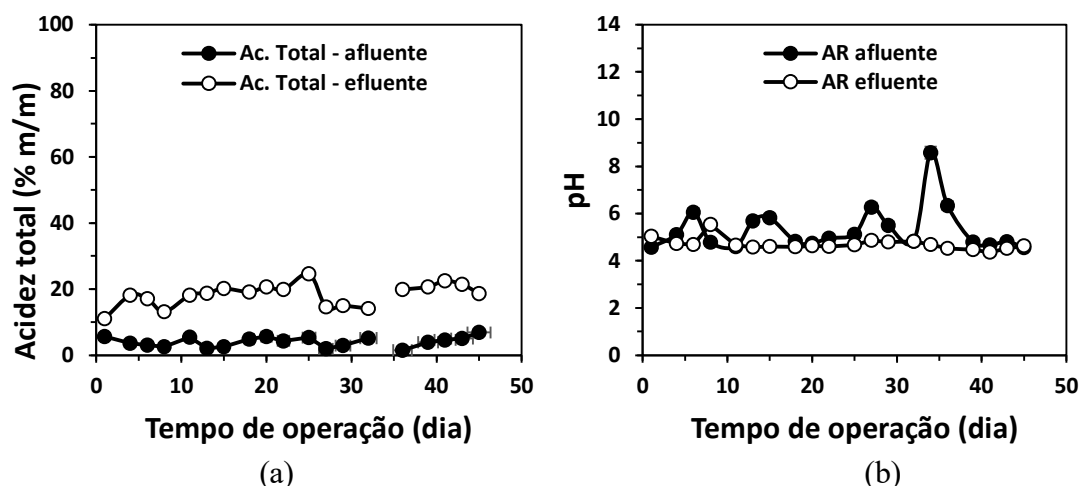


RH5 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 22500U.

Assim como visualizado para o emprego de 7500U (RH3 e RH4), observa-se que a inoculação de 22500U fora efetiva no processo de hidrólise das frações de lipídeos, solubilizando elementos inicialmente insolúveis no meio líquido e convertendo-os em compostos de frações menores com o decorrer do processo hidrolítico/fermentativo (Figura 45). Entretanto, o aumento da concentração de enzimas inoculadas não apresentou efeitos nas taxas de hidrólise enzimática, apresentando intensidade de picos dos analitos sob mesma magnitude do processo carreado por 7500U.

O monitoramento do teor de acidez total do meio e o pH em função do tempo de operação do reator RH5 é mostrado na Figura 46.

Figura 46 – (a) Teor de acidez e (b) pH do reator RH5.



RH5 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 22500U.

O aumento da concentração inicial de enzimas hidrolíticas, de 7500 U para 22500 U, proporcionou incremento do teor de acidez total médio de 4,06% m/m no afluente para 18,31% m/m no efluente, representando 351%, aproximadamente. Comparando com o desempenho do reator RH4, o aumento do teor de acidez total foi 29,49% menor, indicando possível limitação de substrato presente no meio em função da maior concentração de enzimas e microrganismos. Mediante a aplicação de 22500 U, em relação ao monitoramento do pH, os resultados apresentaram valores médios de pH afluente e efluente de 5,33 e 4,70, respectivamente. Valores similares aos apresentados pela inoculação de 7500 U/volume de reator.

Apesar do desempenho apresentado pelo incremento ao sistema de enzimas hidrolíticas e microrganismos (*Penicillium citrinum*) ser próximo ao apresentado pela inoculação de 7500 U, nas mesmas condições operacionais, a aplicação do efluente pré-tratado no reator metanogênico, visando a remoção de DQO e formação de biogás, deve ser analisada. Entretanto, o aumento das unidades enzimáticas não acarretou no incremento das taxas de hidrólise dos principais constituintes da AR de laticínio.

A Tabela 17 resume o desempenho apresentado pelos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos em todas as condições de operação analisadas. Com essa finalidade e alinhando-se com o objetivo principal deste trabalho, a aplicação da AR de laticínio bruta e pré-tratada, a última em reator contínuo hidrolítico/fermentativo, deve ser comparada quanto ao seu desempenho no reator contínuo metanogênico para produção de biogás e remoção de matéria orgânica.

Tabela 17 – Desempenho médio de operação dos reatores hidrolíticos/fermentativos.

Reatores hidrolíticos com TDH de 12 horas	Unidades enzimáticas inoculadas				
	0U/ RHA1	0U/ RHA2	7.500U/ RH3	7.500U/ RH4	22.500U/ RH5
% média de remoção DQO	14±7	8±4	12±7	15±5	16±8
% média de remoção de carboidratos	93±7	90±9	92±19	93±5	97±1
% média de remoção de proteínas	19±13	24±11	19±14	29±15	26±12
% média de remoção de glicerol	84±22	-7*±76	77±26	92±11	77±35
% média de acidez total afluente (m/m)	4±2	4±2	2±1	3±1	4±1
% média de acidez total efluente (m/m)	11±4	23±3	15±1	19±5	18±3
pH afluente médio	5.4±0.9	5.1±0.9	6.6±0.8	5.6±0.7	5±1
pH efluente médio	4.9±0.3	4.3±0.2	6±1	4.6±0.2	4.7±0.2

RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U; RH5 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 22500U.

*Valores negativos da eficiência de remoção de glicerol indicam maior concentração no efluente em relação ao afluente, tal efeito se dá pela diferença das taxas de consumo e formação, nas condições do ensaio realizado.

6.7. Avaliação dos efeitos do pré-tratamento da água residuária de laticínio com células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* na biodigestão anaeróbia para formação de metano e remoção de DQO

Na Etapa 6, o desempenho da aplicação do pré-tratamento biológico, com células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*, atuando na hidrólise da AR de laticínio, em reatores contínuos, foram avaliados quanto à formação de biogás e remoção de DQO, em reator AnSTBR.

Segundo Demirer e Chen (2004), reatores anaeróbios convencionais demandam longos TDHs e grandes áreas. Neste contexto, reatores de elevadas taxas, como o reator UASB (*Up-flow Anaerobic Sludge Blanket*), em todas as variações de escala, e o AnSTBR (*Anaerobic Structured Bed Reactor*), em escala de bancada, são indicados para o tratamento anaeróbio das ARs de laticínios, promovendo a redução do TDH e área requeridos para o processo de tratamento (BELLA; RAO, 2021; SLAVOV, 2017).

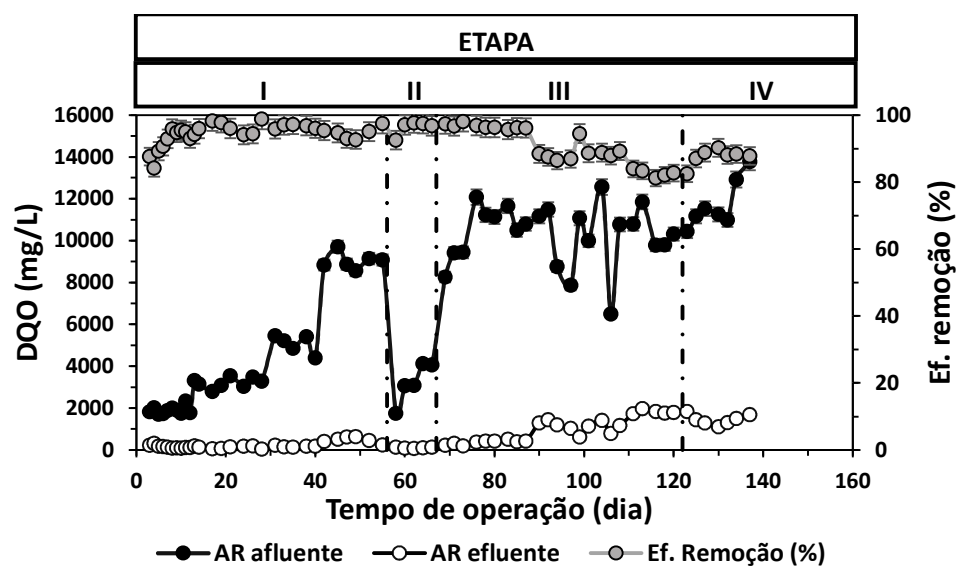
Em reatores contínuos de altas taxas, o processo de estruturação do leito, dado pela imobilização do lodo anaeróbio, aumenta o tempo de retenção de celular (TRC) (SLAVOV, 2017). O TRC é tido como um importante parâmetro operacional para o desenvolvimento do processo de DA, o qual é possível medir o grau de acúmulo de ácidos orgânicos, ajudando na conversão dos lipídeos presentes na AR de laticínio e a atividade metanogênica (ALVES et al., 2009; BELLA; RAO, 2021).

Assim, microrganismos que apresentam crescimento lento, como as bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas, serão beneficiados pelo aumento do tempo de retenção celular no interior do reator anaeróbio metanogênico. A melhor adaptação dos microrganismos, aumento da capacidade tampão e maior segurança contra efeitos de cargas de choque, também, estão associadas com altos valores de TRC (ALVES et al., 2009; BELLA; RAO, 2021).

6.7.1. Biodigestão anaeróbia da água residuária bruta de laticínio

A Figura 47 evidencia o desempenho apresentado pelo reator AnSTBR1, inoculado com lodo anaeróbio granular macerado e operado com AR bruta de laticínio, por 137 dias, em câmara incubadora à temperatura de 37°C e TDH de 42 horas.

Figura 47 – Monitoramento do reator metanogênico AnSTBR1 e suas respectivas etapas de operação quanto à remoção de DQO da água residuária bruta de laticínio.

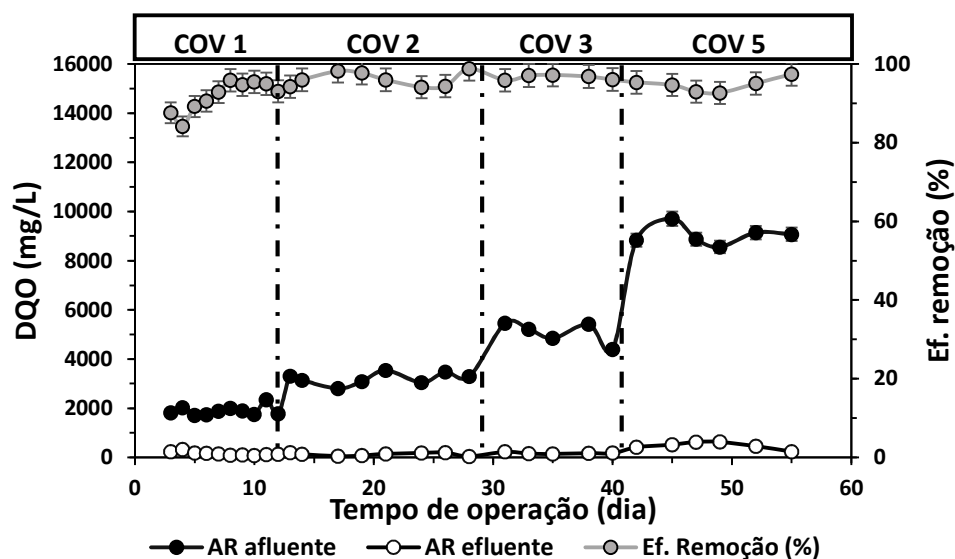


I = aumento gradual da COV afluyente (1,0 – 5,0 kgDQO/m³.dia) para 0,7 gNaHCO₃/gDQO; II = repartida do reator com aumento gradual da COV afluyente (1,0 – 5,0 kgDQO/m³.dia) para 0,7 gNaHCO₃/gDQO; III = redução de alcalinizante adicionado ao sistema reacional (0,7 – 0,1 gNaHCO₃/gDQO) para COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e IV = repartida e preparação do reator para posterior recebimento da AR pré-tratada (5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,5 gNaHCO₃/gDQO).

O reator AnSTBR1 mostra quatro etapas sequenciais de operação, em que o reator foi submetido a cargas orgânicas volumétricas (COVs) crescentes (Etapas I e II) e a redução de alcalinizante adicionado ao meio líquido (Etapas III e IV), sob mesma COV aplicada. Segundo Lettinga et al. (1979), o uso de reatores de alta taxa possibilitam o tratamento de ARs com elevadas COVs.

Na primeira etapa de operação do reator metanogênico AnSTBR1 (primeiros 55 dias de operação), foi realizado o aumento gradativo da COV afluyente de 1 para 5 gDQO/L.dia, mantendo-se a razão de 0,7 gNaHCO₃/gDQO. A Figura 48 apresenta o desempenho do reator metanogênico AnSTBR1 em função do aumento da COV afluyente aplicada para a remoção de MO da AR de laticínio.

Figura 48 – Remoção de DQO da água residuária bruta de laticínios em função do aumento da COV afluyente aplicada para 0,7 gNaHCO₃/gDQO.



COV = carga orgânica volumétrica.

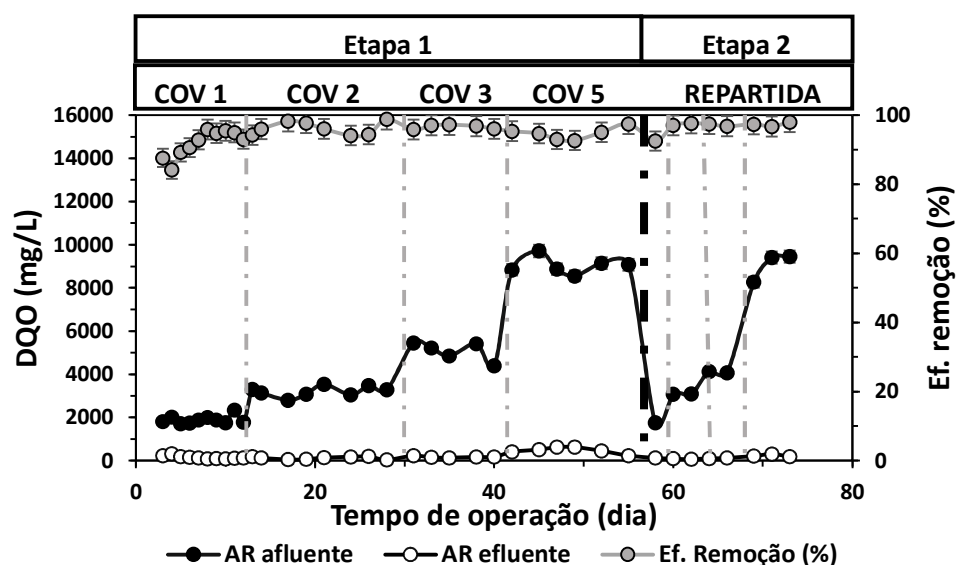
Sob o emprego do TDH teórico de 42 horas, verificou-se que o perfil de remoção de DQO apresentado, em função do incremento de cargas, mostrou eficiência de remoção de DQO superior a 92%. Para a razão de alcalinizante de 0,7 gNaHCO₃/gDQO, o aumento gradativo da COV afluyente não influenciou no perfil de remoção de DQO. Vários autores indicam a realização de adaptação do lodo anaeróbio, visando o tratamento anaeróbio da AR de laticínios (YAN; LO; LIAO, 1989), uma vez que a assimilação de alguns dos seus constituintes, como a caseína, só são assimilados pelos microrganismos mediante a etapa de adaptação (PAVLOSTATHIS; GIRALDO-GOMEZ, 1991). Ademais, os aumentos de COV afluyentes devem ser realizados de forma progressiva, baseado na baixa concentração de ácidos orgânicos, como o acetato e o propionato, indicando funcionamento adequado do processo de DA (YAN, LO; LIAO, 1989).

Eficiências de remoção de DQO acima de 97% foram relatadas por Yan, Lo e Liao (1989) na biodegradação anaeróbia do soro de queijo, utilizando reator UASB, à temperatura de 33°C e 5,96g DQO/L.dia. Entretanto, tais resultados foram obtidos com TDH de 5 dias e após 45 de dias de operação do reator. Valores similares de eficiência de remoção de DQO, 93%, foram obtidos por Arunadevi e Saravananaraja (2020) no tratamento anaeróbio da AR de laticínios, em reator UASB com separação de fases, em temperatura ambiente, TDH de 2,5 dias e COV aplicada de 2,61 – 2,75 kgDQO/m³.dia.

Quando aplicada COV de 3,89 – 4,21 kgDQO/m³.dia e redução do TDH para 1,5 dia, a eficiência de remoção de DQO foi de 79 – 85% no reator metanogênico. Gavala et al. (1999a) observaram eficiência de remoção de DQO de 98% para o tratamento anaeróbico da AR de laticínios em reator UASB, à COV aplicada de 6,2 kgDQO/m³.dia, temperatura de 35°C e TDH de 6 dias.

Entre a primeira e a segunda etapa de operação do reator metanogênico e devido ao interrompimento das atividades laboratoriais (agravamento do COVID-19), o reator AnSTBR1 foi armazenado em câmara fria, por período de 48 dias, à temperatura de 4°C. A Figura 49 apresenta a segunda etapa de operação, representado pelo aumento gradativo da COV afluyente, análoga a condição anterior, entretanto, em período reduzido de 18 dias, para reativação do reator.

Figura 49 – Reativação do reator AnSTBR1 para remoção de DQO da água residuária de laticínios em função do aumento da COV afluyente aplicada para 0,7 gNaHCO₃/gDQO.

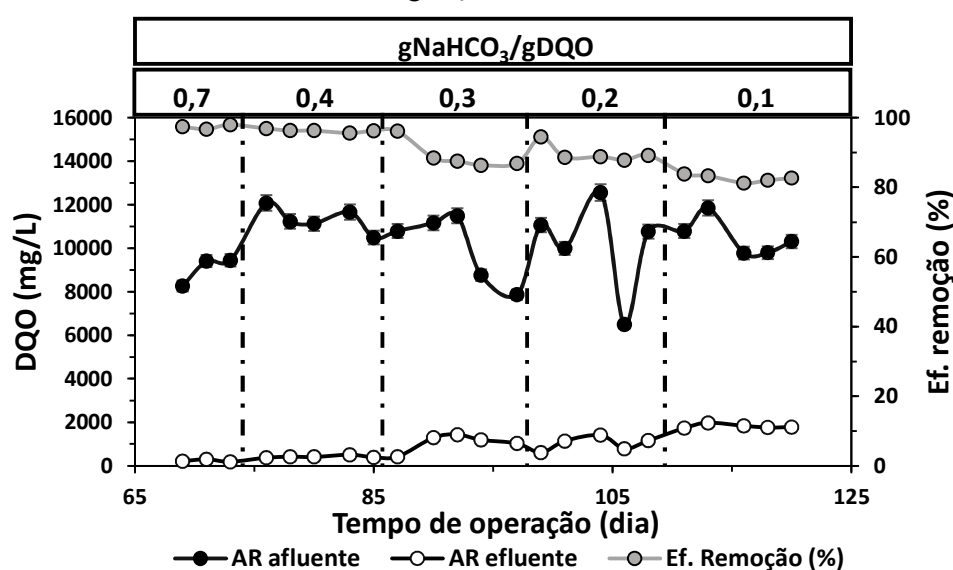


De acordo com a Figura 49, o desempenho da biomassa anaeróbica metanogênica não foi afetado pelo período de armazenamento e interrupção da alimentação do reator, com resultados similares a etapa anterior durante a reativação do reator metanogênico. Tal comportamento, também, foi observado nos estudos de Barbosa et al. (2022) ao analisar estratégias de repartida de um reator metanogênico em escala piloto, alimentado com vinhaça. Segundo os autores, a reativação, após período de interrupção da alimentação, com mesmo tipo de substrato (vinhaça) foi o mais adequado, mantendo-se a produção de metano maior do que em relação a troca de substrato (melaço de cana de

açúcar). Dessa forma, nas Etapas 1 e 2 de operação do reator AnSTBR1, a razão de alcalinidade de 0,7 gNaHCO₃/gDQO se mostrou adequada para o desenvolvimento do processo de DA.

Na Etapa III de operação do reator AnSTBR1, foi realizada a redução do alcalinizante ao sistema, inicialmente, a uma razão de 0,7 para 0,1 gNaHCO₃/gDQO, mantendo-se constante a COV afluyente dentro da faixa de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia, conforme mostra a Figura 50.

Figura 50 – Remoção de DQO em função da redução de alcalinizante para a COV aplicada de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia.



Em função de seus constituintes, geralmente, as AR de laticínios apresentam alcalinidade a carbonato de cálcio (CaCO₃) menor que 500 mg/L, o que não é suficiente para sustentar o processo de DA. Durante a DA, alcalinidade pode ser gerada pela formação de CO₂ liberado, o que resulta na formação de ácido carbônico, alcalinidade a carbonato e alcalinidade a bicarbonato (DEMIREL; YENIGUN, 2004; DEMIREL, YENIGUN, 2006). Na falta ou ausência de alcalinidade, agentes externos podem ser suplementados como o carbonato de cálcio ou sódio, bicarbonato de sódio e outros (BELLA, RAO, 2021).

Segundo Bharati, Shete e Shinkar (2017), a alcalinidade por ser definida com a capacidade de neutralização ou tamponamento de ácido em solução aquosa. Uma vez que o processo de DA gera ácidos orgânicos como intermediários do processo fermentativo e o pH ótimo para o desenvolvimento da DA deve ser próximo ao neutro

(6,7-7,4), alcalinidade deve ser fornecida ao meio para estabilização do pH (BELLA; RAO, 2021; METCALF; EDDY, 2016). Assim, a adição do álcali permite mitigar os efeitos do pH no equilíbrio osmótico celular. O acúmulo de ácidos orgânicos em função das diferentes taxas de crescimento das bactérias acidogênicas e arqueas metanogênicas, provocam distúrbios na estabilidade do reator e afeta o desempenho e desenvolvimento das arqueas metanogênicas (GUTIRREZ, 1991), enquanto o equilíbrio entre a produção e consumo dos ácidos orgânicos é o responsável pelo controle do processo (METCALF; EDDY, 2016).

A redução de alcalinizante por agentes externos esteve associada à redução da eficiência de remoção de DQO (Figura 50) que, contudo, se manteve acima de 80%. A Tabela 18 sintetiza os resultados apresentados para a redução da eficiência de remoção de DQO em função da razão de $\text{gNaHCO}_3/\text{gDQO}$ afluente.

Tabela 18 - Efeitos da redução de alcalinizante sobre a eficiência de remoção de DQO da AR bruta de laticínio.

gNaHCO_3 /gDQO	Redução de alcalinizante (%)	Efic. de remoção de DQO mínima (%)	Efic. de remoção de DQO máxima (%)	Efic. de remoção de DQO média (%)	Carga aplicada (mg/L.dia)	Carga removida (mg/L.dia)
0,7	0	96,72	97,99	97,36	3107	3017
0,4	42,9	95,62	96,89	96,26	6507	6265
0,3	57,2	86,39	96,10	89,05	5759	5140
0,2	71,5	87,83	94,10	89,77	5852	5264
0,1	85,8	81,21	83,92	82,62	6040	4995

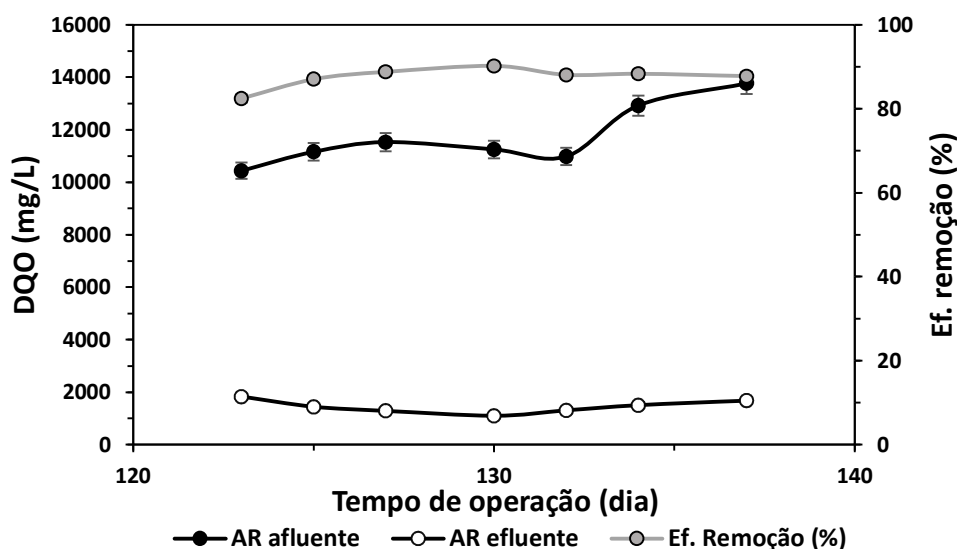
Para valores próximos da COV aplicados ao reator, a redução de 0,7 para 0,4 e de 0,3 para 0,2 $\text{gNaHCO}_3/\text{gDQO}$ não apresentaram efeitos sobre a eficiência de remoção de DQO da AR bruta de laticínio, no reator AnSTBR1, com TDH de 42 horas. As reduções de 0,4 para 0,3 e de 0,2 para 0,1 $\text{gNaHCO}_3/\text{gDQO}$ impactaram negativamente a eficiência de remoção de DQO. Razões de alcalinizante de 0,2 e 0,1 $\text{gNaHCO}_3.\text{gDQO}$ se apresentaram como limitantes para a condução do processo de DA, uma vez que a oscilação da relação AI/AP ocorreu para próximos de 1,5 (Figura 55), indicando instabilidade entre a produção e consumo dos ácidos.

Kispergher et al. (2017) avaliaram os efeitos da alcalinidade (4000 - 1000 mg

NaHCO₃/L) na DA do efluente de laticínio, em reator UASB, TDH de 1 dia e temperatura de 35°C. Segundo os autores, a maior eficiência de remoção de DQO, de 56,62%, foi obtida quando presente 4000 mg NaHCO₃/L. Com o decréscimo da suplementação de alcalinizante por agente externo de 4000 para 1000 mg NaHCO₃/L, foi observado, também, a redução da produção de biogás, de 11,52 NL/dia para 4 NL/dia, e queda no valor do pH efluente de aproximadamente 7,2 para 6,3, respectivamente.

Como última etapa de operação do reator metanogênico AnSTBR1 (Etapa IV) e novamente em função de nova paralisação das atividades laboratoriais (COVID-19), a Figura 51 apresenta o monitoramento da eficiência de remoção de DQO da AR de laticínio, por período de operação de 17 dias e TDH de 42 horas.

Figura 51 – Remoção de DQO da AR de laticínio para a COV aplicada de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,5 gNaHCO₃/gDQO afluente.



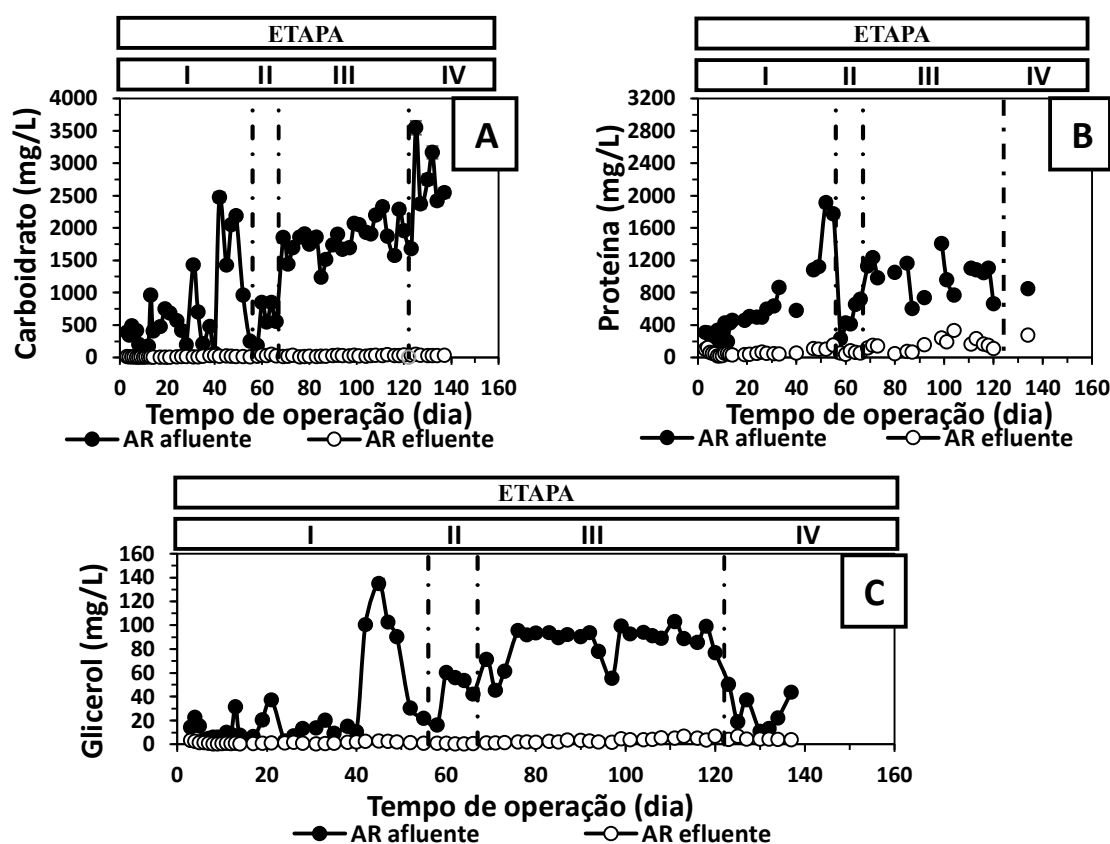
A Etapa IV de operação do reator metanogênico com AR bruta foi realizada como forma de reativação e preparação do reator metanogênico AnSTBR1 para recebimento do afluente pré-tratado em reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum* (AnSTBR2). Tais considerações tiveram o objetivo de determinar o potencial de biodegradação e formação de metano imposta pela realização do pré-tratamento.

De acordo com a Figura 51, o percentual médio da eficiência de remoção de DQO na Etapa IV foi próxima a 87%, em 0,5 gNaHCO₃/gDQO, inferior aos 97% para

adição de 0,7 gNaHCO₃/gDQO e 0,4 gNaHCO₃/gDQO observados na Etapa III, indicando que a alcalinidade é apenas um dos interferentes do processo.

A Figura 52 apresenta o monitoramento global de bioconversão e consumo dos principais constituintes da AR de laticínios (carboidratos, proteínas e gliceróis, o último como produto da hidrólise de lipídeos), durante a operação do reator AnSTBR1 e suas respectivas etapas de operação, em TDH de 42 horas.

Figura 52 – Monitoramento do reator AnSTBR1 e suas respectivas etapas de operação quanto à degradação de (a) carboidratos, (b) proteínas e (c) glicerol da AR bruta de laticínio.



I = aumento gradual da COV afluente (1,0 – 5,0 kgDQO/m³.dia) para 0,7 gNaHCO₃/gDQO; II = repartida do reator com aumento gradual da COV afluente (1,0 – 5,0 kgDQO/m³.dia) para 0,7 gNaHCO₃/gDQO; III = redução de alcalinizante adicionado ao sistema reacional (0,7 – 0,1 gNaHCO₃/gDQO) para COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e IV = repartida e preparação do reator para posterior recebimento da AR pré-tratada (5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,5 gNaHCO₃/gDQO).

De acordo com a Figura 52.a e 52.c, os carboidratos (inicialmente presentes na AR de laticínio) e o glicerol (formado pela hidrólise de lipídeos) foram totalmente mineralizados em TDH de 42 horas no reator metanogênico AnSTBR1. Tal comportamento se assemelha aos ensaios em batelada, independente da inoculação do

reator com biomassa fúngica ou com lodo anaeróbio. Os resultados evidenciam o potencial de biodegradação deste tipo de substrato perante as condições operacionais e ambientais impostas ao reator hidrolítico e ao reator metanogênico.

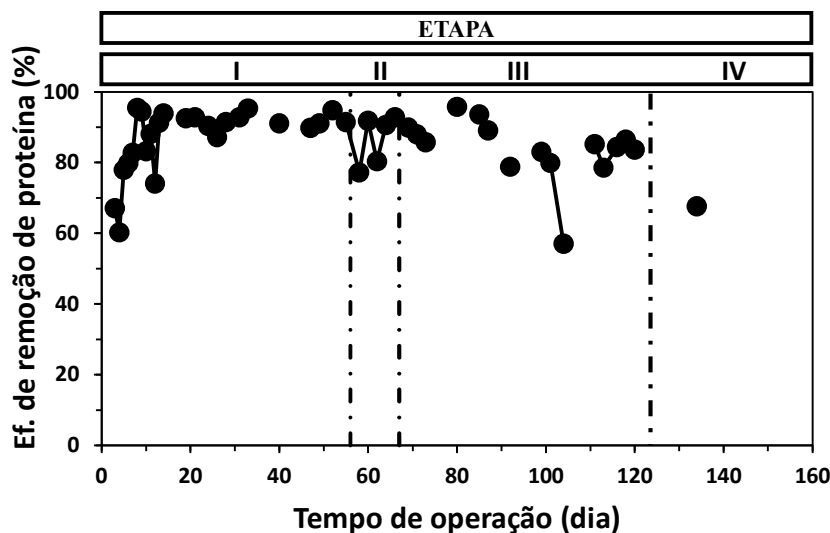
Contrariamente aos perfis apresentados pelos ensaios em batelada e pelo o reator contínuo inoculado com biomassa fúngica (reator hidrolítico/fermentativo), cuja eficiência de remoção de proteínas ficaram em torno de 30%, a operação do reator metanogênico AnSTBR1 apresentou eficiência média de remoção de proteína de 86,78%, resultado de todas as etapas de operação do reator metanogênico (Figura 52.b).

No geral, as proteínas presentes nas ARs de laticínios são hidrolisadas, pelas enzimas proteolíticas (proteases) em polipeptídios e aminoácidos, sendo, posteriormente, transformadas em ácidos orgânicos pelas bactérias acidogênicas anaeróbias (PAVLOSTATHIS; GIRALDO-GOMEZ, 1991; VIDAL et al., 2000). Uma vez que a caseína é composta por glicoproteínas e fosfoproteínas, durante sua decomposição pelo processo de DA, resíduos de açúcar e fosfato são gerados (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Na acidogênese, os aminoácidos são reduzidos a compostos mais simples, formando, também, amônia e sulfeto de hidrogênio. Na acetogênese, os compostos reduzidos de aminoácidos são transformados em ácido acético, como substrato para a metanogênese, formando metano e dióxido de carbono (BELLA; RAO, 2021).

Segundo Kolhe, Ingale e Bhole (2002), a decomposição anaeróbia das proteínas, mais especificamente a caseína, leva a formação de um lodo preto e pesado, com forte odor. Tais características se devem a formação de ácido butírico, como intermediário da fermentação ácida das proteínas presentes na AR de laticínios. A Figura 53 apresenta a eficiência de remoção de proteína ao longo da operação do reator metanogênico AnSTBR1 com AR bruta de laticínio.

No início da operação do reator AnSTBR1, na Etapa I, observa-se o aumento da porcentagem de remoção de proteínas concomitantemente à adaptação do lodo anaeróbio para a assimilação deste tipo de substrato, sob mesma COV afluyente aplicada e razão de alcalinizante no sistema. O aumento gradual de carga é importante para adaptação do lodo anaeróbio, conforme especificado por Vidal et al. (2000) e Pavlostathis e Giraldo-Gomez (1991).

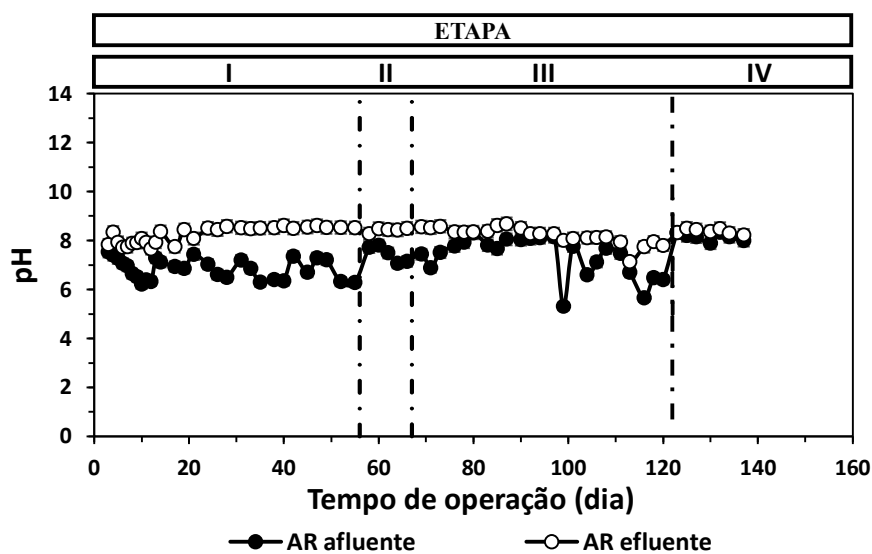
Figura 53 – Perfil da eficiência de remoção das proteínas presentes na AR bruta de laticínio durante a operação do reator metanogênico AnSTBR1.



I = aumento gradual da COV afluyente ($1,0 - 5,0 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{dia}$) para $0,7 \text{ gNaHCO}_3/\text{gDQO}$; II = repartida do reator com aumento gradual da COV afluyente ($1,0 - 5,0 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{dia}$) para $0,7 \text{ gNaHCO}_3/\text{gDQO}$; III = redução de alcalinizante adicionado ao sistema reacional ($0,7 - 0,1 \text{ gNaHCO}_3/\text{gDQO}$) para COV de $5,0 - 7,0 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{dia}$ e IV = repartida e preparação do reator para posterior recebimento da AR pré-tratada ($5,0 - 7,0 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{dia}$ e $0,5 \text{ gNaHCO}_3/\text{gDQO}$).

A Figura 54 representa o monitoramento do pH afluyente e efluyente em função do tempo de operação do reator metanogênico AnSTBR1, com TDH de 42 horas.

Figura 54 – Monitoramento do pH do reator metanogênico e suas respectivas etapas de operação.



I = aumento gradual da COV afluyente ($1,0 - 5,0 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{dia}$) para $0,7 \text{ gNaHCO}_3/\text{gDQO}$; II = repartida do reator com aumento gradual da COV afluyente ($1,0 - 5,0 \text{ kgDQO/m}^3 \cdot \text{dia}$) para $0,7 \text{ gNaHCO}_3/\text{gDQO}$; III = redução de alcalinizante adicionado ao sistema reacional ($0,7 - 0,1$

gNaHCO₃/gDQO) para COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e IV = repartida e preparação do reator para posterior recebimento da AR pré-tratada (5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,5 gNaHCO₃/gDQO).

A cada TDH operacional de 42 horas, observa-se que os valores de pH efluente foram maiores que os valores apresentados pelo pH afluente (Figura 54). Em função das condições de operação e em virtude da suplementação de alcalinizante ao sistema, o valor médio de pH efluente foi de 8,26 e o afluente 7,21. Não houve queda significativa do valor de pH efluente em função da diminuição da alcalinidade fornecida pela adição de agentes externos (Etapa III), o que poderia comprometer a eficiência do processo de DA, assim como observado nos estudos Kispergher et al. (2017).

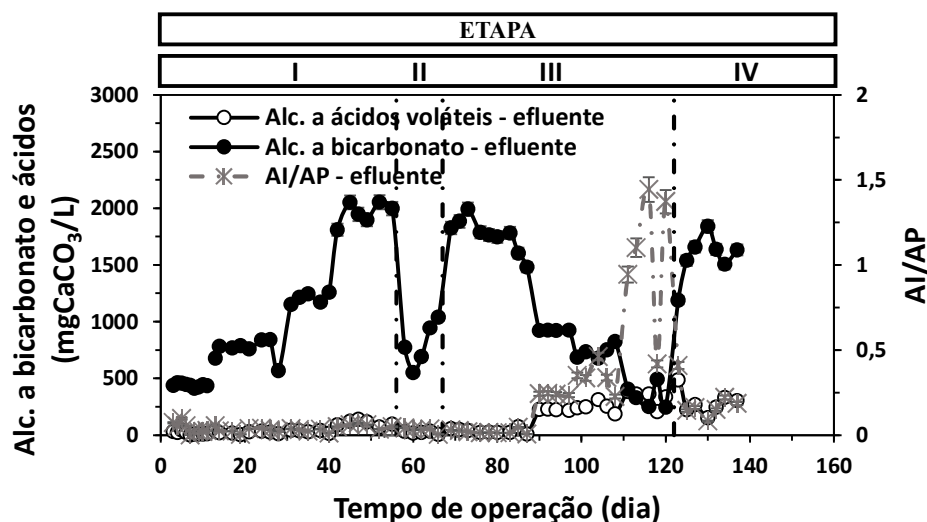
Na DA, as bactérias acidogênicas apresentam crescimento rápido e preferem a faixa de pH de 5,2 – 6,5 (meio ácido). As bactérias acetogênicas se desenvolvem melhor na faixa de pH entre 6,6 – 7,6, enquanto que as arqueas metanogênicas, com menor taxa de crescimento, se desenvolvem melhor em pH 7,5 – 8,5 (meio alcalino) (DEMIRER; CHEN, 2004). Neste contexto, uma faixa ótima de pH para a condução do processo de DA é requerida. Segundo Campos et al. (2006), a faixa ótima de pH do reator anaeróbio metanogênico, para a formação de biogás e remoção de MO, deve ser entre 6,0 e 8,0. Valores inferiores a 5,5 e superiores a 8,5 são considerados restritivos para o bom desenvolvimento e desempenho da comunidade bacteriana e arqueias envolvidas no processo de biodigestão anaeróbia (CAMPOS et al., 2006; METCALF; EDDY, 2016). De acordo com os valores de pH apresentados durante a operação do reator metanogênico AnSTBR1, o pH do sistema se encontra dentro das faixas ótimas de desempenho para a formação de biogás e remoção de MO da AR bruta de laticínio.

Bharati, Shete e Shinkar (2017) destacam os efeitos do pH afluente sobre o desempenho de biorreatores metanogênicos. Segundo os autores, afluentes ricos em lactose, como as ARs de laticínios, apresentam condições ótimas para o desenvolvimento de bactérias acidogênicas, em função da rápida fermentação dos carboidratos presentes, promovendo o acúmulo de ácidos orgânicos no meio reacional, queda do pH e comprometimento da etapa de metanogênese. Para tanto, os autores destacam a necessidade de fornecimento de alcalinidade para o bom desempenho da DA do efluente de laticínios.

Alinhado aos valores de pH obtidos durante a operação do reator metanogênico com AR bruta e TDH de 42 horas, a Figura 55 apresenta o monitoramento da disponibilidade de alcalinidade, em forma de alcalinidade a bicarbonato, alcalinidade a

ácidos voláteis e avaliação do parâmetro AI (alcalinidade intermediária)/AP (alcalinidade parcial).

Figura 55 – Monitoramento da alcalinidade do reator metanogênico AnSTBR1 operado com AR bruta de laticínio.



I = aumento gradual da COV afluyente (1,0 – 5,0 kgDQO/m³.dia) para 0,7 gNaHCO₃/gDQO; II = repartida do reator com aumento gradual da COV afluyente (1,0 – 5,0 kgDQO/m³.dia) para 0,7 gNaHCO₃/gDQO; III = redução de alcalinizante adicionado ao sistema reacional (0,7 – 0,1 gNaHCO₃/gDQO) para COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e IV = repartida e preparação do reator para posterior recebimento da AR pré-tratada (5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,5 gNaHCO₃/gDQO).

Nas ARs em geral, em pH neutro, a alcalinidade a bicarbonato é a principal fonte de alcalinidade no meio. Nas ARs de laticínios, para manter o valor de pH superior a 6,3, pelo menos 500-900 mg CaCO₃/L, como alcalinidade a bicarbonato, deve estar presente (BHARATI; SHETE; SHINKAR, 2017). Valores de alcalinidade superiores a 2500 mg/L e pequenas variações do pH do meio favorecem o desenvolvimento do efeito tampão em reatores metanogênicos (CHEAH; VIDAL-ANTICH; DOSTA, 2019).

De acordo com a Figura 55, o aumento gradual da COV afluyente aplicada na primeira e segunda etapa de operação do reator metanogênico AnSTBR1, foi acompanhado pelo aumento da concentração de alcalinidade a bicarbonato do sistema, passando de 500 para aprox. 2000 mg CaCO₃/L, sob mesma razão de alcalinizante adicionada de 0,7 gNaHCO₃/gDQO e TDH de 42 horas. Uma vez que a razão de adição de agente alcalinizante por grama de DQO se manteve constante, nas Etapas I e II, o aumento da alcalinidade a bicarbonato de forma gradual ao aumento da COV aplicada

expressa a alcalinidade gerada pelo processo de DA, somada a alcalinidade afluyente da própria AR. Segundo Bella e Rao (2021), o aumento da COV requer menor quantidade de suplementação por agentes alcalinizantes externos. Tal fato é atribuído pelos autores pela auto regulação da alcalinidade no sistema em função da degradação dos substratos iniciais pela rota de DA.

Na terceira etapa de operação do reator AnSTBR1, a redução gradual de alcalinizante de 0,7 para 0,1 gNaHCO₃/gDQO, para a mesma COV afluyente de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e TDH de 42 horas, acompanhou a redução da concentração de alcalinidade a bicarbonato. Com a redução de agente alcalinizante adicionado e acúmulo de ácidos voláteis no sistema, observa-se que os valores finais de alcalinidade a bicarbonato, aprox. 250 mg CaCO₃/L (Etapa III, próximos a 120 dias de operação do reator), poderiam não sustentar a DA e acarretar na acidificação do reator, se operado por mais tempo. Ainda, pode-se observar que o emprego de 0,2 e 0,1 gNaHCO₃/gDQO ocasionaram no aumento significativo do parâmetro AI/AP, próximos a 1,5. Tal condição se torna limitante para estabilização do pH do meio reacional dentro das condições ótimas de operação, visando a metanogênese. Valores do parâmetro AI/AP superiores a 1,5 poderiam ocasionar a acidificação do reator metanogênico, uma vez que a alcalinidade a ácidos orgânicos (representante do parâmetro AI) seria muito superior a alcalinidade a bicarbonato (representante do parâmetro AP).

Com a repartida do reator metanogênico AnSTBR1, na Etapa IV de operação, nas condições de COV afluyente de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia, 0,5 gNaHCO₃/gDQO e TDH de 42 horas, verificou-se o reestabelecimento da maior concentração de alcalinidade a bicarbonato e redução do parâmetro AI/AP, indicando o potencial de rápido reestabelecimento da comunidade metanogênica quando expostas à condições de perturbação e estresse.

6.7.2. Biodigestão anaeróbia da água residuária de laticínio pré-tratada com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*

A fim de testar a hipótese de que o emprego do pré-tratamento hidrolítico, com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*, apresenta potencial de redução do tempo de tratamento anaeróbio necessário para formação de biogás e redução de MO, à mesma COV afluyente aplicada (5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia) e razão de alcalinizante (0,3 gNaHCO₃/gDQO), ensaios contínuos foram realizados com biomassa

anaeróbia e AR pré-tratada, em reator AnSTBR2.

A Tabela 19 sintetiza as condições afluentes da operação do reator metanogênico AnSTBR2 operado com AR pré-tratada.

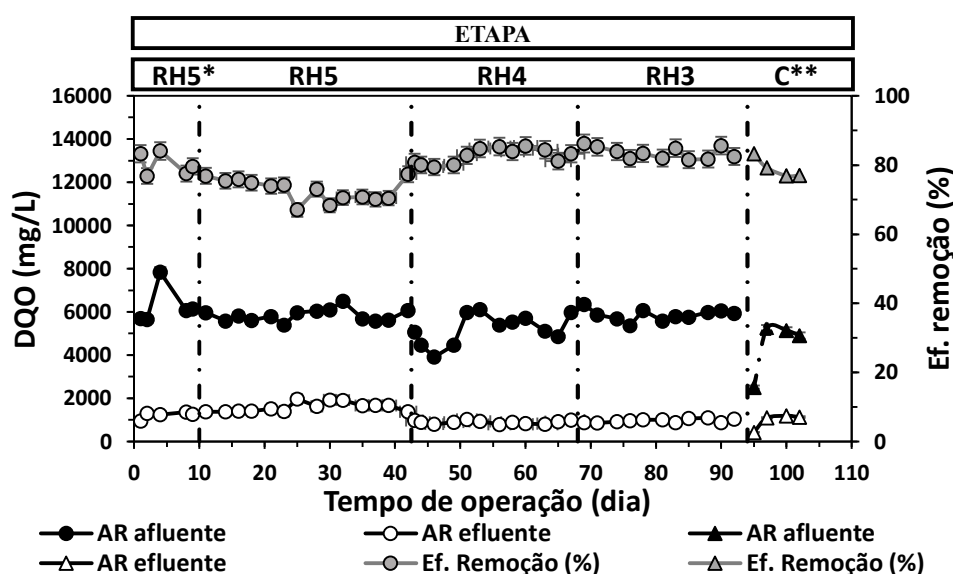
Tabela 19 – Síntese das condições afluentes do reator metanogênico AnSTBR2.

Condição	Regime	Tipo de leito /topo do reator	Concentração de enzimas inoculadas
RH5	Contínuo	Estruturado/fechado	22500 U
RH4	Contínuo	Estruturado/fechado	7500 U
RH3	Contínuo	-/aberto	7500 U
RHA1 e RHA2	Contínuo	-	-

RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo inoculado com células íntegras de *Penicillium citrinum*; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo inoculado com células íntegras de *Penicillium citrinum*; RH5 = reator hidrolítico/fermentativo inoculado com células íntegras de *Penicillium citrinum*.

A Figura 56 mostra a operação do reator metanogênico AnSTBR2 com AR pré-tratada, resultado do tratamento biológico em reator contínuo hidrolítico/fermentativo. Nesta etapa, o TDH teórico foi de 20 horas, a operação transcorreu por 102 dias, em câmara incubadora, à temperatura de 37°C.

Figura 56 – Monitoramento do reator metanogênico AnSTBR2 e suas respectivas etapas de operação quanto à remoção de DQO da AR de laticínio pré-tratada. Carga orgânica volumétrica afluente de 5 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO.



RH5* = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,6 gNaHCO₃/gDQO); RH5 = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com

o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH4 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH4 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH3 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH3 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); C** = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com os efluentes dos reatores autoinoculados RHA1 e RHA2 (Δ) (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO).

Nos primeiros 10 dias de operação, o reator metanogênico AnSTBR2 foi operado com 0,6 gNaHCO₃/gDQO, sendo, posteriormente, reduzidos a 0,3 gNaHCO₃/gDQO. Visando a possível aplicação em sistema de tratamento com planta em escala plena, tal condição implica em redução significativa de custos de tratamento, principalmente no que diz respeito a aquisição de agentes químicos para controle do processo (VON SPERLING, 1998).

A Tabela 20 apresenta os resultados médios de eficiência de remoção de DQO, além das concentrações médias de DQO afluente e efluente, durante a operação do reator metanogênico AnSTBR2.

Tabela 20 – Eficiência de remoção de DQO, concentração afluente e efluente do reator metanogênico AnSTBR2, operado com AR pré-tratada dos reatores hidrolíticos/fermentativos, sob suplementação de 0,3 gNaHCO₃/gDQO.

Condição afluente - AnSTBR2	DQO média afluente (mg/L)	DQO média efluente (mg/L)	Eficiência de remoção de DQO (%)	Carga removida (mg/L.dia)
RH5*	6280±898	1226±159	80,3±3,3	6318±86
RH5	5834±289	1590±220	72,8±3,2	5305±153
RH4	5215±697	894±79	82,7±2,2	5401±261
RH3	5855±267	962±86	83,5±1,7	6116±196
C**	4449±797	956±359	79,1±3,0	4366±91

RH5* = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,6 gNaHCO₃/gDQO); RH5 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH4 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH4 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH3 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH3 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); C** = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com os efluentes dos reatores autoinoculados RHA1 e RHA2 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO).

A operação do reator AnSTBR2 com a AR pré-tratada, resultante do pré-tratamento RH3, foi quem apresentou a maior eficiência média de remoção de DQO e

taxa de remoção de carga orgânica, para a adição de 0,3 gNaHCO₃/gDQO e COV afluente de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia. Em comparação com os resultados apresentados pelo reator metanogênico AnSTBR1 (alimentado com AR bruta), sob mesma COV e gNaHCO₃/gDQO, a média da eficiência de remoção de DQO foi de 89,06%, com carga média removida de 5140 mg/L.dia (Tabela 18). Tal eficiência de remoção de DQO é pouco superior aos valores médios obtidos pela realização do pré-tratamento hidrolítico. Entretanto, a carga orgânica removida, expressa em mg/L.dia, foi maior nas etapas de metanogênese utilizando AR pré-tratada com células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum*, principalmente na condição RH3 com valor de 6116 mg/L.dia.

Levando-se em consideração o tempo de tratamento decorrido em ambas as condições, o tratamento com lodo anaeróbio foi realizado em TDH teórico de 42 horas e em única etapa. Na condição que prevê a realização do pré-tratamento hidrolítico/fermentativo seguido do tratamento com lodo anaeróbio, o tempo requerido total foi de apenas 32 horas, sendo o TDH do pré-tratamento de 12 horas, acrescidos de 20 horas do tratamento metanogênico. Menores valores de TDH implicam no processamento de maiores volumes de AR/dia, reduzindo-se custos capitais e a possibilidade de redução do volume do reator necessário ao tratamento. Entretanto, a drástica redução do TDH empregado pode resultar na lavagem da biomassa, comprometendo a eficiência do reator (COTTA-NAVARRO; CARILLO-REYES; VAZQUEZ, 2011).

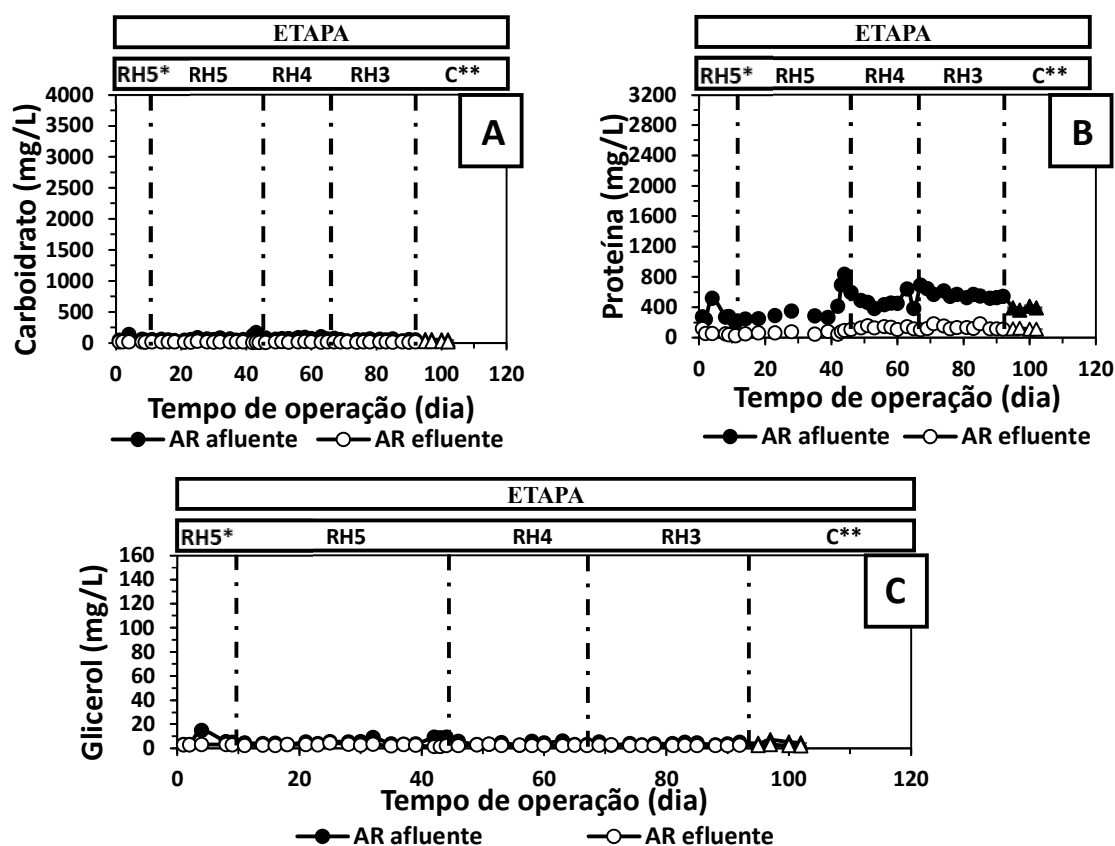
Bella e Rao (2021) destacam que a escolha do TDH deve obedecer ao tempo de regeneração dos microrganismos necessários à condução da biodigestão anaeróbia e ao tipo de reator utilizado. Para a biodigestão anaeróbia do efluente de laticínios em reator UASB, valores de TDH entre 10 e 50 horas são indicados para o tratamento da COV aplicada entre 2 a 15 kgDQO/m³.dia, alcançando eficiências de remoção de DQO entre 70 a 90% (BELLA; RAO, 2021). Neste contexto, ressalta-se que não foi observada a lavagem da biomassa na corrente da saída do reator anaeróbio metanogênico de fluxo ascendente, mediante a redução do valor de TDH de 42 horas para 20 horas. Ainda, os valores de TDH empregados nas etapas DA (metanogênese) estão de acordo com os valores indicados na literatura para o tipo de reator utilizado (BELLA; RAO, 2021).

Assim, em relação à remoção de MO da AR de laticínio, o emprego do pré-tratamento biológico com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum* trouxe benefícios ao tratamento anaeróbio convencional. Tais efeitos foram corroborados aos resultados próximos de eficiência de remoção de DQO, em tempo de

tratamento total reduzido. Essa vantagem conduz à fortes estímulos para a realização de futuros trabalhos com aumento de escala, piloto e plena.

De forma a análoga à etapa anterior, a Figura 57 apresenta o monitoramento global de consumo dos principais constituintes da AR de laticínios (carboidratos, proteínas e glicéris), durante a operação do reator metanogênico AnSTBR2 com AR pré-tratada.

Figura 57 – Monitoramento do reator metanogênico AnSTBR2 e suas respectivas etapas de operação quanto à degradação de (a) carboidratos, (b) proteínas e (c) glicéris da AR de laticínio pré-tratada.



RH5* = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,6 gNaHCO₃/gDQO); RH5 = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH4 = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH4 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH3 = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH3 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); C** = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com os efluentes dos reatores autoinoculados RHA1 e RHA2 (Δ) (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO).

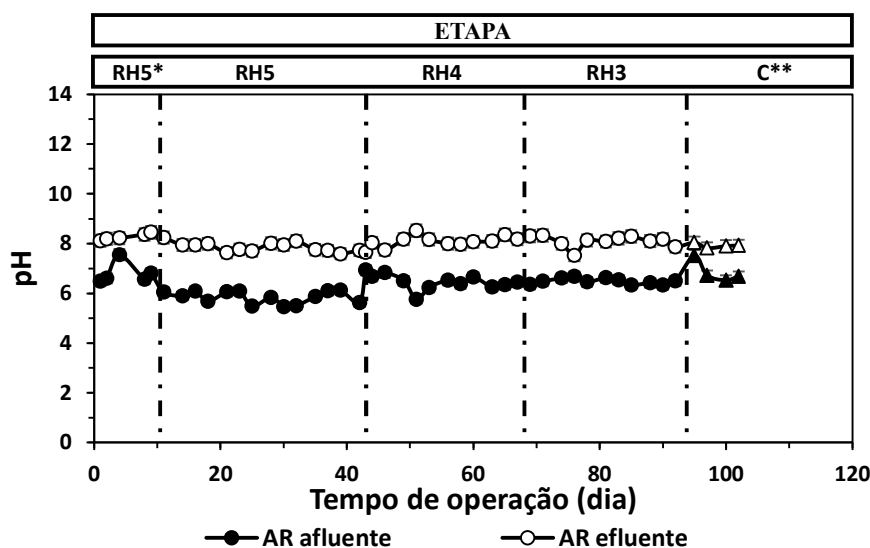
Em comparação com a análise dos principais substratos do afluente do reator metanogênico AnSTBR1 e de acordo com a Figura 57, a concentração de carboidratos,

proteínas e gliceróis no afluente são muito menores, evidenciando a eficácia do pré-tratamento realizado. Neste sentido, a concentração dos substratos primários, inicialmente presentes da AR bruta, foram convertidos em ácidos orgânicos no reator hidrolítico/fermentativo com biomassa fúngica, para serem transformados e consumidos, posteriormente, no reator metanogênico.

Para o TDH de 20 horas no reator metanogênico AnSTBR2, os carboidratos, proteínas e os gliceróis foram quase totalmente consumidos pelos microrganismos anaeróbios. Ademais, verifica-se que o lodo anaeróbio inoculado no reator AnSTBR2 com AR pré-tratada, proveniente do reator AnSTBR1, dispensou a etapa de adaptação para assimilação dos constituintes da classe de proteínas, anteriormente visualizados na operação inicial do reator metanogênico AnSTBR1 com AR bruta.

A Figura 58 representa o monitoramento do pH afluente e efluente em função do tempo de operação do reator metanogênico AnSTBR2 com afluente pré-tratado e TDH de 20 horas de operação.

Figura 58 – Monitoramento do pH do reator metanogênico AnSTBR2 com afluente pré-tratado e suas respectivas etapas de operação.

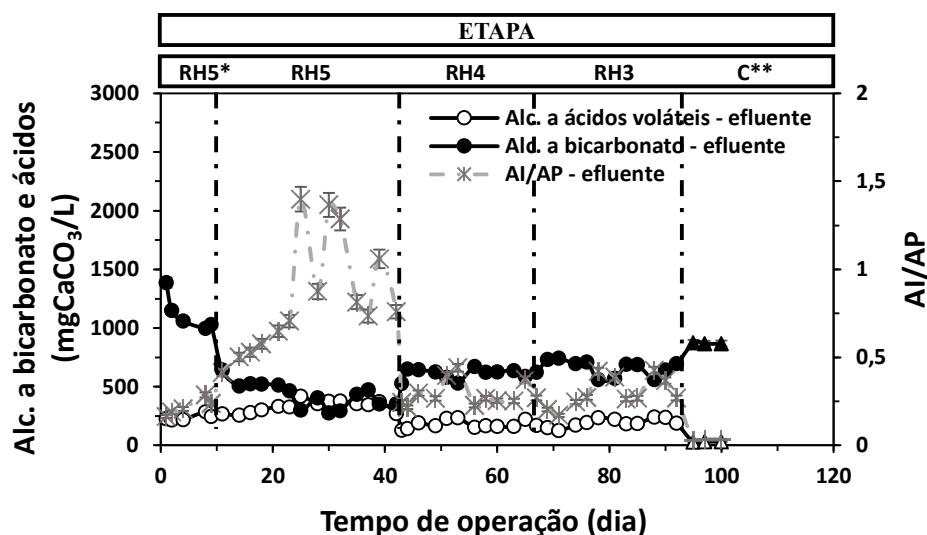


RH5* = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,6 gNaHCO₃/gDQO); RH5 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH4 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH4 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH3 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH3 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); C** = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com os efluentes dos reatores autoinoculados RHA1 e RHA2 (Δ) (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³ .dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO).

De acordo com a Figura 58, o valor médio do pH afluente pré-tratado e efluente foi de 6,35 e 8,02, respectivamente. Ambas as configurações do reator metanogênico, AnSTBR1 (AR bruta) e AnSTBR2 (AR pré-tratada), levaram ao pH efluente próximos a 8,0, encontrando-se dentro da faixa ótima para o melhor desempenho do processo metanogênico (CAMPOS et al., 2006; METCALF; EDDY, 2016).

A Figura 59 apresenta o monitoramento da disponibilidade de alcalinizante efluente, em forma de alcalinidade a bicarbonato, alcalinidade a ácidos voláteis e avaliação do parâmetro AI/AP, do reator metanogênico AnSTBR2.

Figura 59 – Monitoramento da alcalinidade do reator metanogênico AnSTBR2 operado com AR pré-tratada.



RH5* = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,6 gNaHCO₃/gDQO); RH5 = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH4 = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH4 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH3 = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com o efluente do reator RH3 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); C** = alimentação do reator metanogênico AnSTBR2 com os efluentes dos reatores autoinoculados RHA1 e RHA2 (Δ) (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO).

Associado ao desempenho de remoção de MO e produção de biogás, pode-se verificar maior concentração de alcalinidade a bicarbonato durante a operação do reator metanogênico AnSTBR2 nas etapas RH4 e RH3, ficando próximas a 700 mg CaCO₃/L (Figura 59). Vale destacar que somente a Etapa RH5* foi conduzida com alcalinidade adicionada de 0,6 gNaHCO₃/gDQO, demais etapas foram realizadas com adição de bicarbonato na razão de 0,3 gNaHCO₃/gDQO, para a mesma COV afluente de 5,0 – 7,0

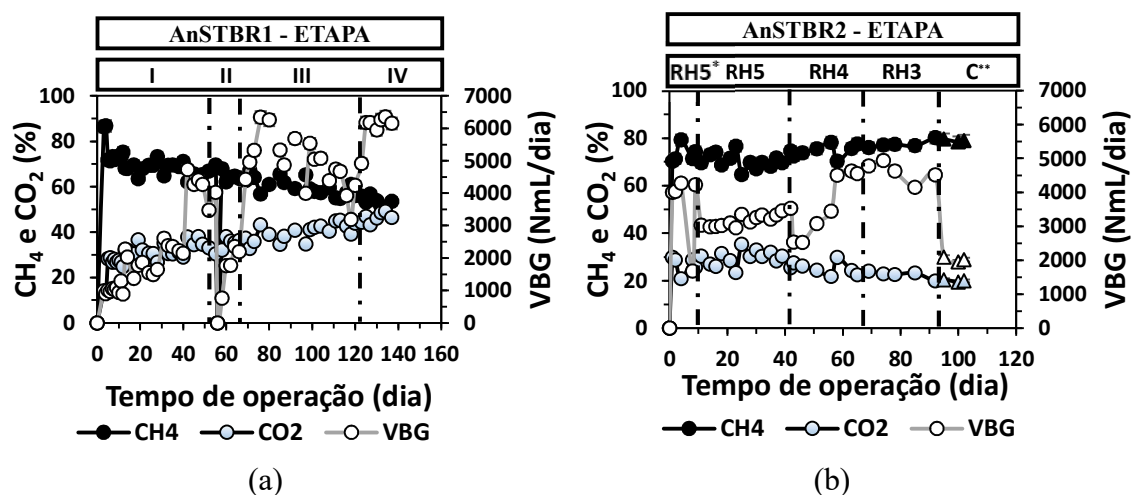
kgDQO/m³.dia. Em função dos dados analisados, pode-se concluir que alcalinidade a bicarbonato foi gerada pelo processo anaeróbio de tratamento, autorregulando a DA.

Ainda que a operação do reator metanogênico AnSTBR2 na Etapa C** tenha apresentado as maiores concentrações de alcalinidade a bicarbonato, mantendo o pH efluente dentro das condições ótimas do processo metanogênico, os resultados apresentados quando à produção de metano não foram superiores aos resultados apresentados pela aplicação do pré-tratamento hidrolítico/fermentativo com células integras do fungo filamentosso *P. citrinum* (item 6.7.3.1).

6.7.3.1. Avaliação dos efeitos do pré-tratamento com biomassa fúngica na produção de metano

Nesta etapa, foi avaliada a hipótese de que a realização do pré-tratamento hidrolítico/fermentativo, com células integras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*, influencia positivamente a qualidade de produção do biogás no reator metanogênico. A Figura 60 evidencia a taxa de produção volumétrica do biogás (VBG), porcentagens de metano (CH₄%) e dióxido de carbono (CO₂%) produzidos ao longo da operação do reator metanogênico AnSTBR, com AR bruta e AR pré-tratada de laticínio.

Figura 60 – Taxa de produção de biogás, porcentagem de CH₄ e CO₂ durante a operação do reator metanogênico (a) AnSTBR1, alimentado com AR bruta e TDH de 42 horas, e (b) AnSTBR2, alimentado com AR pré-tratada e TDH 20 horas.



I = aumento gradual da COV afluyente (1,0 – 5,0 kgDQO/m³.dia) para 0,7 gNaHCO₃/gDQO; II = repartida do reator com aumento gradual da COV afluyente (1,0 – 5,0 kgDQO/m³.dia) para 0,7 gNaHCO₃/gDQO; III = redução de alcalinizante adicionado ao sistema reacional (0,7 – 0,1 gNaHCO₃/gDQO) para COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e IV = repartida e preparação do reator para posterior recebimento da AR pré-tratada (5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,5 gNaHCO₃/gDQO).

RH5* = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 –

7,0 kgDQO/m³.dia e 0,6 gNaHCO₃/gDQO); RH5 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH5 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH4 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH4 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); RH3 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH3 (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO); C** = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com os efluentes dos reatores autoinoculados RHA1 e RHA2 (Δ) (COV de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia e 0,3 gNaHCO₃/gDQO).

Em relação à qualidade do biogás gerado no reator metanogênico (AnSTBR), verifica-se que a realização do pré-tratamento hidrolítico/fermentativo com células íntegras do fungo filamentososo *Penicillium citrinum*, sobre a AR de laticínio, resultaram na melhor estabilização de produção e qualidade do biogás, sob mesma COV aplicada (5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia) e razão de alcalinizante (0,3 gNaHCO₃/gDQO). De acordo com a Figura 60.b, o percentual de CH₄ e de CO₂, praticamente, se mantiveram desde o início da operação do reator AnSTBR2, apresentando cerca de 75% de CH₄ e 25% de CO₂, durante os 102 dias de monitoramento. No reator AnSTBR1 (alimentado com AR bruta), Figura 60.a, o percentual de metano no biogás partiu em torno de 70% e foi decaindo com o aumento da COV afluyente aplicada ao reator, até chegar em 50%, em 137 dias de operação. Nos estudos realizados por Zielinska et al. (2013), o aumento da COV afluyente de 1,0 para 2,0 kgDQO/m³.dia influenciou negativamente na qualidade do biogás produzido durante a biodigestão anaeróbia da AR de laticínio, em reator de leite estruturado aquecido por micro-ondas, à temperatura de 35 e 55°C e TDH de 1 dia.

Com a realização do pré-tratamento biológico da AR de laticínio, mediado pelo uso de células íntegras nos reatores contínuos, observa-se o melhor desempenho das Etapas de operação RH4 e RH3, quanto a taxa de produção volumétrica do biogás (VBG). Tais etapas apresentaram comportamento similar quanto a remoção de DQO da AR pré-tratada. Nas etapas RH4 e RH3, a VBG calculada foi aproximadamente 4500 NmL/dia, para COV afluyente de 5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia, 0,3 gNaHCO₃/gDQO e 75% de metano no biogás. Quando comparado com os valores do reator metanogênico AnSTBR1, operado com AR bruta, sob mesma COV afluyente e razão NaHCO₃ por grama de DQO, a VBG calculada foi próxima, estando em torno de 5000 NmL/dia, entretanto com menor porcentagem de metano no biogás. Tais efeitos no reator metanogênico, apresentados pelo pré-tratamento da AR de laticínio, associados com a redução do tempo total requerido para o tratamento deste tipo de efluente, torna-se promissor.

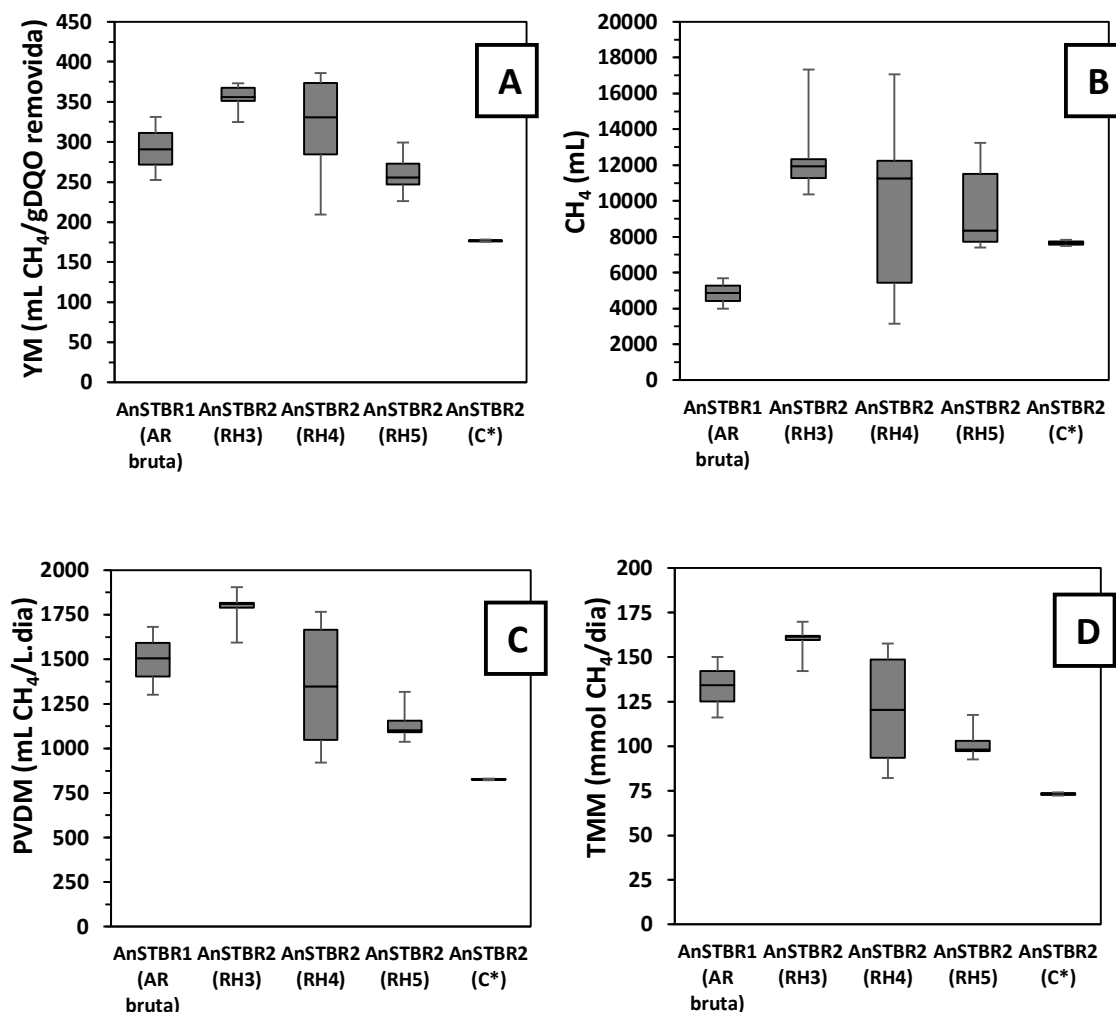
Durante as Etapas I e II de operação do reator metanogênico AnSTBR1,

observa-se o aumento gradual de VGB em função do aumento da COV afluyente aplicada. Porém, na Etapa III, referente a redução da razão $\text{gNaHCO}_3/\text{gDQO}$, o efeito contrário é observado, onde houve redução da VGB até 4000 NmL/dia para 0,1 $\text{gNaHCO}_3/\text{gDQO}$ e COV afluyente de 5 $\text{kgDQO}/\text{m}^3\cdot\text{dia}$. Na Etapa IV de operação, assim como para remoção de DQO, o reator foi rapidamente reestabelecido mediante a adição de 0,5 $\text{gNaHCO}_3/\text{gDQO}$ e mesma COV afluyente aplicada.

A COV indica a quantidade de MO alimentada por unidade de dia e volume de reator (METCALF; EDDY, 2016). Uma vez que a COV varia em função da composição da AR afluyente, tal parâmetro estima o potencial metabólico necessário ao tratamento da fração biodegradável da AR. Na presença de alcalinidade suficiente para regular o processo de DA, o aumento da COV afluyente conduz ao aumento da vazão de biogás, constituído, majoritariamente, de CH_4 e CO_2 , até que a alimentação atinja a capacidade limite de tratamento em função das diferentes taxas de crescimento dos microrganismos presentes e atividades metabólicas (BELLA; RAO, 2021). Com a redução da razão de alcalinizante por grama de DQO afluyente, mantendo-se a COV afluyente constante, à medida que a alcalinidade a bicarbonato vai sendo consumida, associada à produção de compostos na fase ácida, sem consumo na fase metanogênica, ocorre prejuízo à DA. O desequilíbrio entre as arqueias metanogênicas e as bactérias acidogênicas/acetogênicas desfavorecem as relações de transferência de hidrogênio interespecies, resultando na queda da produção de metano (STAMS; PLUGGE, 2009).

Os efeitos do pré-tratamento hidrolítico/fermentativo, na metanogênese, quanto ao rendimento de metano calculado (YM); a produção volumétrica de metano (mL de CH_4); a taxa molar de metano (TMM) e a produção volumétrica diária de metano (PVDM) são mostrados na Figura 61.

Figura 61 – Operação do reator metanogênico AnSTBR, com AR bruta e pré-tratada, especificando o metano em função do (a) rendimento calculado – YM; (b) produção volumétrica – mL de CH₄; (c) produção volumétrica diária – PVDM e (d) taxa molar – TMM.



Cálculos baseados na mesma COV afluyente aplicada ao reator (5,0 – 7,0 kgDQO/m³.dia) e 0,3 gNaHCO₃/gDQO; RH5 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH5 (22500 U – topo fechado e leito estruturado); RH4 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH4 (7500 U – topo fechado e leito estruturado); RH3 = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com o efluente do reator RH3 (7500 U – topo aberto e biomassa livre); C* = alimentação do reator metanogênico AnSTBTR2 com os efluentes dos reatores autoinoculados RHA1 (topo aberto – autoinoculado) e RHA2 (topo fechado – autoinoculado).

De acordo com a Figura 61.a, é possível observar que as etapas RH4 e RH3 de operação do reator metanogênico AnSTBR2 apresentaram os melhores rendimentos de metano (YM), tanto em relação as demais etapas do mesmo reator, como em relação com as etapas do reator metanogênico AnSTBR1, operado com AR bruta, sob as mesmas condições operacionais (COV e razão de alcalinizante). Nas etapas RH4 e RH3 do reator AnSTBR2, o rendimento de metano calculado foi de 338-355 mL CH₄/gDQO removida. Em comparação com as demais fases do mesmo reator, os valores de YM

foram inferiores a 260 mL CH₄/gDQO removida. Em relação as fases do reator metanogênico AnSTBR1, o YM calculado foi de 290 mL CH₄/gDQO removida.

Verifica-se que os valores referentes ao volume de metano produzido (Figura 61.b) foram superiores nos ensaios metanogênicos conduzidos com AR pré-tratada, para todas as etapas, alcançando valores médios máximos para as fases RH4 e RH3 de operação do reator AnSTBR2, próximos a 11950 e 11200 mL CH₄, respectivamente. Quando comparado com o volume de metano produzido no reator AnSTBR1, o valor médio calculado foi de 4900 mL CH₄.

Em relação a produção volumétrica diária de metano (PVDM) (Figura 60.c) e a taxa molar de metano (TMM) (Figura 61.d), a Etapa RH3 do reator AnSTBR2 foi quem se destacou, apresentando os maiores valores e menor variância entre os dados de desempenho durante a operação do reator metanogênico. De acordo com os dados observados para a Etapa C* de operação do reator AnSTBR2 e em comparação com o reator AnSTBR1 (ausência de pré-tratamento), destaca-se o incremento da porcentagem de metano no biogás gerado (Figura 60.b).

O sucesso na utilização da biomassa fúngica, representada pelo cultivo e emprego de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, com capacidade hidrolítica foi observado com respeito à redução de carga orgânica e produção de metano no sistema proposto. O reduzido custo de produção comparado com a extração e purificação de enzimas representam aspecto positivo importante para proposição de processos aplicados ao tratamento de efluentes de laticínios.

6.8. Avaliação taxonômica da comunidade microbiana dos reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos

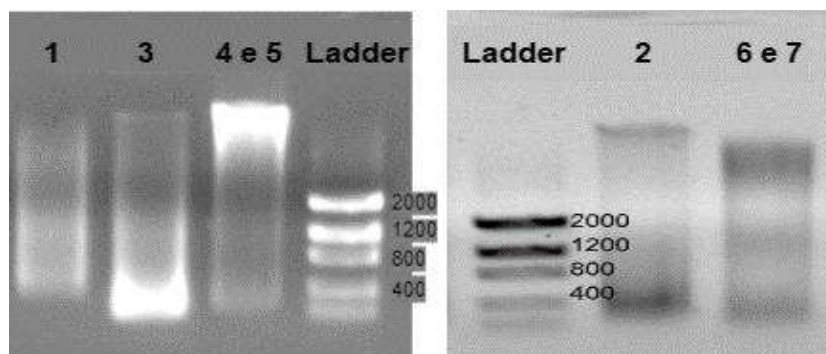
Na Etapa 7 e última da presente pesquisa, após a finalização de operação dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos (RHA1, RHA2, RH3, RH4 e RH5) e dos reatores contínuos metanogênicos (AnSTBR1 e AnSTBR2), foram retiradas parcelas da biomassa para a caracterização da comunidade microbiológica.

6.8.1. Avaliação da pureza e concentração dos fragmentos de DNA genômico extraídos das amostras ambientais microbianas

Com a tomada de alíquotas do material efluente e da biomassa, tanto fúngica

como do lodo anaeróbio, foi realizada a extração dos fragmentos de DNA e a verificação da sua integridade. A Figura 62 mostra as imagens digitais das amostras de DNA extraído, pós corrida em EGA. A Tabela 21 relaciona a quantidade de fragmentos de DNA em cada banda, em função de seu tamanho de fragmento e volume de amostra aplicada, comparando com o padrão (“*ladder*”) utilizado.

Figura 62 – Imagens digitais das corridas em EGA das amostras 1, 2, 3, 4/5 e 6/7.



1 = amostra da AR bruta de laticínio; 2 = amostra da fase líquida dos reatores hidrolíticos/fermentativos autoinoculados (RHA1 e RHA2); 3 = amostra da biomassa dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras (RH3, RH4 e RH5); 4 e 5 = amostra da biomassa do reator metanogênico AnSTBR1; 6 e 7 = amostra da biomassa do reator metanogênico AnSTBR2.

Tabela 21 - Quantidade de DNA em função do tamanho de fragmento para diferentes volumes de amostra aplicada.

Tamanho de fragmento (pb*)	2 μ L	4 μ L	8 μ L
2000**	100 ng	200 ng	400 ng
1200**	60 ng	120 ng	240 ng
800**	40 ng	80 ng	160 ng
400**	20 ng	40 ng	80 ng
200**	10 ng	20 ng	40 ng
100**	5 ng	10 ng	20 ng

* pb = pares de base

** o pb ao lado de cada n° expressa a quantidade de pb presentes no comprimento do fragmento de DNA.

Pós corrida em EGA e obtenção das relações apresentadas pela Figura 62 e Tabela 21, verifica-se que as amostras ambientais apresentaram boa fragmentação do DNA genômico extraído, necessárias para emprego dos principais métodos de sequenciamento genômico (terminação de cadeia ou sequenciamento *Sanger*, pirosequenciamento, sequenciamento *Illumina/Solexa* e *SOLID*[®] *sequencing*).

A técnica de EUV se torna útil para a caracterização qualitativa e quantitativa de

biomoléculas, tais como a de ácidos nucleicos, formadas por nucleotídeos (unidade básica) (FLECK; MUNRO, 1962; SCHNEIDER, 1945). Segundo Nelson e Cox (2017), os nucleotídeos apresentam banda de absorção intensa e característica em 260 nm. Entretanto, como as medições de absorvância medem quaisquer moléculas que absorvem neste comprimento de onda (260 nm), a purificação das amostras contendo ácido nucleico deve ser realizada para garantir resultados precisos. Neste contexto, para a determinação da pureza das soluções de DNA, a relação 260/280 foi utilizada. Razões de 1,8 são, geralmente, aceitas como “puras” para o DNA, enquanto que razões de 2,0 são aceitas como “puras” para o RNA. Valores abaixo dessa relação indicam contaminação das amostras por fenol, proteínas ou outros contaminantes que absorvem fortemente em 280 nm (NELSON; COX, 2017, THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2009).

A Tabela 22, apresenta a relação entre a concentração de fragmentos de DNA extraídos das amostras ambientais microbianas, referentes a operação dos reatores contínuos, e seu grau pureza.

Tabela 22 – Concentração e pureza das soluções de DNA extraído.

Amostra	Concentração de DNA ($\mu\text{g/L}$)	Relação 260/280 nm
1	53,6	1,98
2	335,7	1,93
3	154,4	2,18
4	161,3	1,88
5	161,3	1,88
6	267,7	1,88
7	267,7	1,88

1 = amostra da AR bruta de laticínio; 2 = amostra da fase líquida dos reatores hidrolíticos/fermentativos autoinoculados (RHA1 e RHA2); 3 = amostra da biomassa dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras (RH3, RH4 e RH5); 4 e 5 = amostra da biomassa do reator metanogênico AnSTBR1; 6 e 7 = amostra da biomassa do reator metanogênico AnSTBR2.

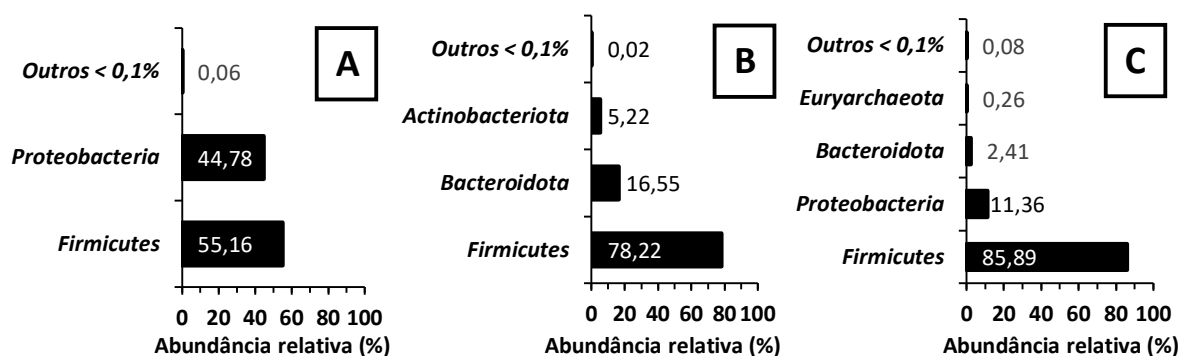
Os resultados da Tabela 22, complementados com a Tabela 21, indicaram amostras microbianas fragmentadas com boa qualidade para posterior sequenciamento de nucleotídeos dentro do domínio *Bactéria/Archaea* e *Fungi*.

6.8.2. Avaliação do sequenciamento genômico para identificação das bactérias e

arquéias presentes ao final da operação dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos

O sequenciamento genômico para a identificação e caracterização da comunidade bacteriana e arqueias, presentes nas amostras ambientais dos reatores biológicos, foram dados pela amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. A Figura 63 apresenta os filos identificados nas amostras ambientais representantes da AR bruta, dos reatores hidrolíticos/fermentativos RHA1 e RHA2 (controle autoinoculados) e dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum* (RH3, RH4 e RH5).

Figura 63 – Filos do domínio *Bacteria/Archaea* identificados nas amostras ambientais de (a) AR bruta - amostra 1, (b) controle autoinoculados (RHA1 e RHA2) - amostra 2 e (c) reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum* (RH3, RH4 e RH5) - amostra 3.



Verifica-se que os filos de *Firmicutes* foram predominantes nas três amostras ambientais sequenciadas. Segundo Madigan et al. (2016), a maioria das bactérias do filo *Firmicutes* são representantes gram-positivas, podem produzir endósporos e são resistentes a condições ambientais extremas. Pertencente ao filo *Firmicutes*, *Clostridium sensu stricto* foi quem apresentou a maior abundância relativa (AbRel), presente tanto nos reatores controle (RHA1 e RHA2 - autoinoculados) (51,8%) como nos reatores hidrolíticos inoculados com células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum* (RH3, RH4 e RH5) (58,9%).

Segundo Dueholm et al. (2021) e Nierychlo et al. (2020), os clostrídios são bactérias em forma de haste, gram-positivas, mesofílicas, anaeróbias estritas, fermentativas e podem esporular. Tais bactérias metabolizam compostos como carboidratos, álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos e purinas (SARKAR et al., 2016).

Em função de sua seletividade por substratos, os clostrídios podem ser classificados em dois grupos, os *Clostridia saccharolytica*, reportados por serem fermentadores de carboidratos e ácidos orgânicos, enquanto que possuem baixa atividade metabólica contra proteínas (MITCHELL, 1992), e os *Clostridia proteolytica*, conhecidos por apresentarem elevada atividade metabólica assimilando as proteínas (aminoácidos) como substratos preferenciais (SEBAIHIA et al., 2023). A atividade lipolítica do *Clostridium* também é observada junto com *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Achromobacter* (CARPINÉ et al., 2010; TERRA; FRIES; TERRA, 2004). O ácido butírico é definido com um produto específico do *Clostridium*, porém, também, são encontrados o ácido acético, láctico, etanol, propanol e o butanol, em concentrações variadas. Na degradação das proteínas pelo *Clostridium*, um dos principais compostos da AR de laticínios, é observada a fermentação de pares de aminoácidos pela reação de *Stickland* (KUNZ; STEINMETZ; DO AMARAL, 2019).

A Tabela 23 apresenta os ácidos orgânicos, em termos de concentrações médias e porcentagens médias em relação ao total de ácidos formados, presentes na AR bruta (afluente) e nos efluentes dos reatores controle (RHA1 e RHA2 - autoinoculados) e dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* (RH3, RH4 e RH5).

Tabela 23 - Ácidos orgânicos formados nas fases operacionais dos reatores hidrolíticos/fermentativos e na AR bruta de laticínio.

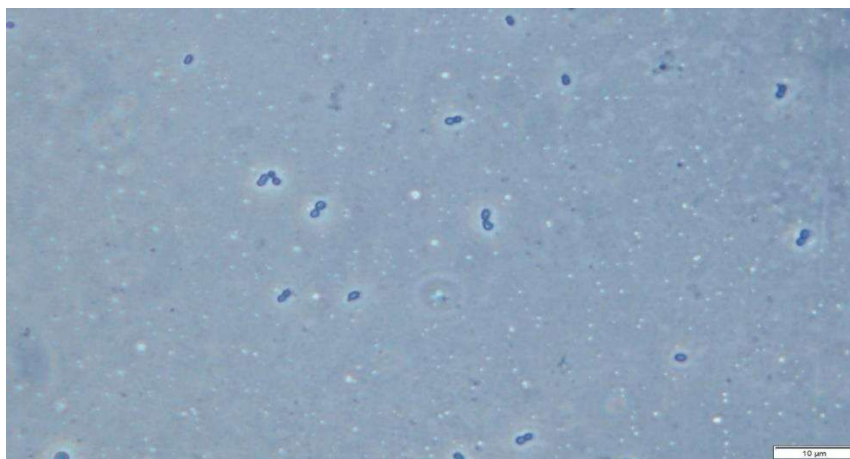
Ácido orgânico	Concentração (mg/L) – Porcentagem (%)		
	AR bruta	R. Controle (RHA ₁ e RHA ₂ - autoinoculados)	R. Hidrolítico (RH ₃ , RH ₄ e RH ₅)
Ácido acético	438 – 21	53 – 7	614 – 32
Ácido butírico	-	310 – 42	677 – 36
Ácido capróico	-	55 – 7	162 – 9
Ácido fórmico	144 – 7	-	10 – 0,5
Ácido isobutírico	191 – 9	160 – 22	269 – 14
Ácido isovalérico	-	30 – 4	30 – 2
Ácido láctico	1300 – 62	-	10 – 0,5
Ácido propiônico	26 – 1	32 – 4	48 – 3
Ácido valérico	-	104 – 14	87 – 5

De acordo com a Tabela 23, a elevada concentração de ácido butírico evidência a ocorrência de *Clostridium sensu stricto*, presentes majoritariamente nas amostras dos reatores controle (autoinoculados) e dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentososo *P. citrinum*. O *Clostridium sensu stricto* e a presença de ácido butírico não foram observadas na AR bruta. O ácido orgânico presente em maior porcentagem na AR bruta de laticínio foi o ácido láctico, representando 61,9 % do total de ácidos, seguido do ácido acético (20,9%) e o ácido isobutírico (9,1%). Na AR bruta, o principal gênero pertencente ao filo *Firmicutes* foi o *Streptococcus*, apresentando abundância relativa de 41,4%.

Os *Streptococcus* são microrganismos gram-positivos, anaeróbios facultativos e, em geral, possuem metabolismo fermentativo, sendo capazes de metabolizar carboidratos como a glicose, frutose, manose, lactose, entre outros sacarídeos (XU et al., 2007). Segundo Whiley e Hardie (2009), os carboidratos são fermentados por este grupo de microrganismos em ácido láctico, além de pequenas concentrações de ácido acético, fórmico, etanol e dióxido de carbono. Tal fato, corrobora as concentrações e porcentagens dos ácidos orgânicos majoritários presentes na AR bruta de laticínio desta pesquisa.

A Figura 64 mostra a micrografia em contraste de fase da AR bruta de laticínio, o qual é possível identificar a morfologia característica de formato arredondado e, frequentemente, arranjadas em cadeia do gênero de bactérias semelhantes à *Streptococcus* (MADIGAN et al., 2016).

Figura 64 – Micrografia óptica com contraste de fase e aumento de 1250x da AR bruta do laticínio Hopelat, evidenciando a presença de bactérias similares ao *Streptococcus*.



Os *Streptococcus*, juntamente com os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*, todos pertencentes ao filo *Firmicutes*, formam a essência do grupo de bactérias do ácido láctico (BAL) (VINDEROLA et al, 2019). As BAL podem crescer em diferentes temperaturas, adaptar a ambientes ricos em nutrientes e com elevadas concentrações de sal (NaCl) (VINDEROLA et al, 2019), característico da AR de laticínio, principalmente quando gerada da produção de queijos (MENDES, 2004). Ainda, são observadas tolerâncias em ambientes ácidos ou alcalinos (VINDEROLA et al, 2019).

Quando comparados os ácidos orgânicos identificados no afluente (AR bruta) e no efluente dos reatores hidrolíticos, verifica-se maior diversidade de ácidos (Tabela 23) mediante o emprego do processo de hidrólise com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum* (RH3, RH4 e RH5). Também, é possível observar que ao final de 12h de TDH do processo hidrolítico com biomassa fúngica, os principais ácidos orgânicos no efluente passam a ser o ácido butírico (36%), seguido do ácido acético (32%), o último precursor direto do acetato para posterior formação de biogás no processo de metanogênese acetoclástica (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998). Nos reatores controle (autoinoculados), a produção de ácido acético representou apenas 7,1% do total de ácidos formados no efluente, o qual o ácido butírico e o isobutírico foram os compostos majoritários com 41,6% e 21,6%, respectivamente.

Diversas mudanças qualitativas de gêneros caracterizados em amostras estão relacionadas com a composição residual dos ácidos orgânicos produzidos e as mudanças quantitativas (abundância relativa) com a variação da taxa de produção de metano durante a DA da AR (LEE et al., 2010). Domingos et al. (2016) classificaram a produção dos ácidos orgânicos, durante a fermentação do soro de leite, em duas etapas sequenciais: (a) a conversão da lactose, presente neste tipo de água residuária, em ácido láctico e (b) a conversão do ácido láctico em uma mistura de diversos ácidos orgânicos. Altas taxas de produção de ácidos orgânicos são observadas quando a estrutura da comunidade microbiana se desenvolve em suportes com predominância de alguns gêneros de microrganismos (DOMINGOS et al., 2016). Assim, a predominância de *Lactobacillus*, esteve relacionada com a alta taxa de produção do ácido butírico e ácido hexanóico. Tal gênero foi predominante em todos os reatores contínuos fermentativos operados por Domingos et al. (2016), sob diferentes valores de TDHs e COVs aplicadas, à temperatura de 37°C. Tal gênero também foi identificado na corrente afluente (AR

bruta do presente estudo), entretanto em menor abundância relativa que o *Streptococcus*.

Domingos et al. (2016) observaram, ainda, que a abundância relativa do *Lactobacillus* foi diminuída, em detrimento ao aumento da abundância relativa de *Clostridium* a partir dos primeiros dias de operação. Aumentos da abundância relativa de *Clostridium*, no lodo granular anaeróbio, em relação as condições iniciais do processo de DA da AR de laticínio e do soro da produção de queijo Mozzarella com resíduos da produção de manteiga, também foram identificados nos estudos de Charalambous et al. (2019) e Pagliano et al. (2019), respectivamente. Pagliano et al. (2019) verificaram que as bactérias produtoras de ácido láctico, indicado pela presença de *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae*, foram predominantes no início da operação, decaindo gradualmente com o aumento da concentração de clostrídio, representado pelas famílias de *Clostridiaceae* e *Tissierellaceae*. Nos estudos realizados por McATEER et al. (2020), a predominância de *Lactobacillus* esteve relacionada com a temperatura de operação do reator UASB, operado com COV 7,5-9,0 kgDQO/m³.dia e AR de laticínio. Em temperaturas mais amenas, até 15°C de digestão anaeróbia, predominou *Lactobacillus*.

Deste modo, pode-se atribuir a *Lactobacillus* e *Streptococcus* à fase de conversão de lactose em ácido láctico e *Clostridium* à fase de produção de ácidos orgânicos. Tais resultados apresentados por Domingos et al. (2016), Charalambous et al. (2019) e Pagliano et al. (2019) corroboram os resultados encontrados nesta pesquisa, uma vez que inicialmente, foram verificados maior abundância relativa de *Streptococcus*, presente na AR bruta (afluente), podendo relacionar este à fase inicial de conversão da lactose em ácido láctico e a consequente conversão em ácidos orgânicos pela maior abundância relativa encontrada de *Clostridium* nas amostras do reator controle (autoinoculados) e hidrolítico (inoculado com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*).

O filo *Proteobacteria*, composto de bactérias gram-negativas com diversos tipos de morfologia e metabolismo variado (BRENNER et al., 2005), não foi identificado nas amostras dos reatores controle (autoinoculados). Tal filo é um dos maiores em termos de diversidade de gênero em relação ao domínio *Bacteria* (MADIGAN et al., 2016). Vários estudos relacionam a predominância do filo *Proteobacteria* com a microbiota de lodos ativados e a capacidade de desnitrificação (ANDRADE, 2016; MOURA, 2014, SEVIOUR; NIELSEN, 2010; SILVA, 2015). O gênero com maior abundância relativa pertencente ao filo de *Proteobacteria* foi *Escherichia-Shigella* (37,1%) para a amostra

contendo AR bruta (afluente) e *Pseudomonas* (8,4%) para as amostras dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum* (RH3, RH4 e RH5).

Escherichia-Shigella foi identificado somente na amostra contendo AR bruta de laticínio, relacionado à sobrevivência em meios de elevada acidez por curtos períodos (DUEHOLM et al., 2021). Tal gênero, pertencente a classe de *Gammaproteobacteria*, trata-se de bactérias anaeróbias facultativas, com forma de bastão, imóveis e não esporuladas. São intimamente relacionadas com *Escherichia coli* e *Salmonella*. A *Escherichia-Shigella* pode realizar a fermentação de carboidratos através da via *Embden-Meyerhof*, o qual apresenta característica bioquímica singular para clivar o ácido pirúvico a fim de produzir ácido fórmico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). De acordo com a Tabela 23, pode-se observar a produção de ácido fórmico na AR bruta de laticínio (afluente) e no efluente da operação dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*, entretanto, o último em menor concentração. As *Pseudomonas*, também pertencentes a classe de *Gammaproteobacteria* e encontradas nos reatores hidrolíticos/fermentativos (RH3, RH4 e RH5), são bactérias gram-negativas, bacilares, aeróbias, móveis e, geralmente, não estão relacionadas com a fermentação (HOLLOWAY, 1969). As *Pseudomonas*, geralmente, requerem necessidades mínimas de nutrientes para sobrevivência, podem crescer em ambientes contaminados com petróleo, alquibenzeno linear sulfonado (LAS) e hidrocarbonetos aromáticos (CERQUEIRA et al., 2012; DELFORNO et al., 2015) e são capazes de reduzir nitrato, degradando o etanol, via respiração aeróbia, como fonte de carbono (BRENNER et al., 2005).

Em menor proporção, o filo de *Bacteroidota* esteve presente nas três amostras analisadas. Tal filo apresentou abundância relativa de 0,03% para a amostra contendo AR bruta, 16,5% para as amostras referentes ao reator controle (autoinoculados) e 2,40% para as amostras dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras do fungo filamentosso *Penicillium citrinum*. Nas águas, as bactérias do filo *Bacteroidota* ajudam na decomposição da matéria orgânica, como as bactérias do gênero *Alistipes*, *Lentimicrobium* e *Prevotella* (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016).

Na amostra do reator controle e na amostra do reator hidrolítico, o principal gênero do filo *Bacteroidota* foi o *Prevotella*, representando abundância relativa de 16,54 e 2,35%, respectivamente. As bactérias de *Prevotella* são gram-negativas, mesofílicas, não formadoras de esporos, com morfologia na forma de bastonetes curtos

ou cocobacilos e são fermentadores de carboidratos, as quais vivem sob condições anaeróbias. Os principais produtos da fermentação da glicose são o acetato e o succinato (DUEHOLM et al., 2021; NIERYCHLO et al., 2020). Nas amostras efluentes dos reatores hidrolíticos/fermentativos autoinoculados e inoculados com células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*, bem como no afluente representado pela AR de laticínio, não foram identificados ácido succínico em concentrações significativas. Enquanto que o ácido acético representou 21% do total de ácidos da AR bruta, 7% do total de ácidos identificados nos reatores controles e 32% dos ácidos presentes nos reatores inoculados com biomassa fúngica (Tabela 23).

Não foram encontrados microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea* para a amostra de AR bruta de laticínio e para as amostras dos reatores controles (autoinoculados). 0,26% de abundância relativa foi identificada nas amostras dos reatores hidrolíticos/fermentativos inoculados com células íntegras fúngicas (RH3, RH4 e RH5), os quais foram identificadas a presença de *Methanobacterium*, representante do filo *Euyarchaeota*. As arqueias de *Methanobacterium* são imóveis, anaeróbias e podem utilizar o formiato para reduzir o metano, outros membros do gênero utilizam a via hidrogenotrófica para produzir metano a partir do hidrogênio e do dióxido de carbono (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016).

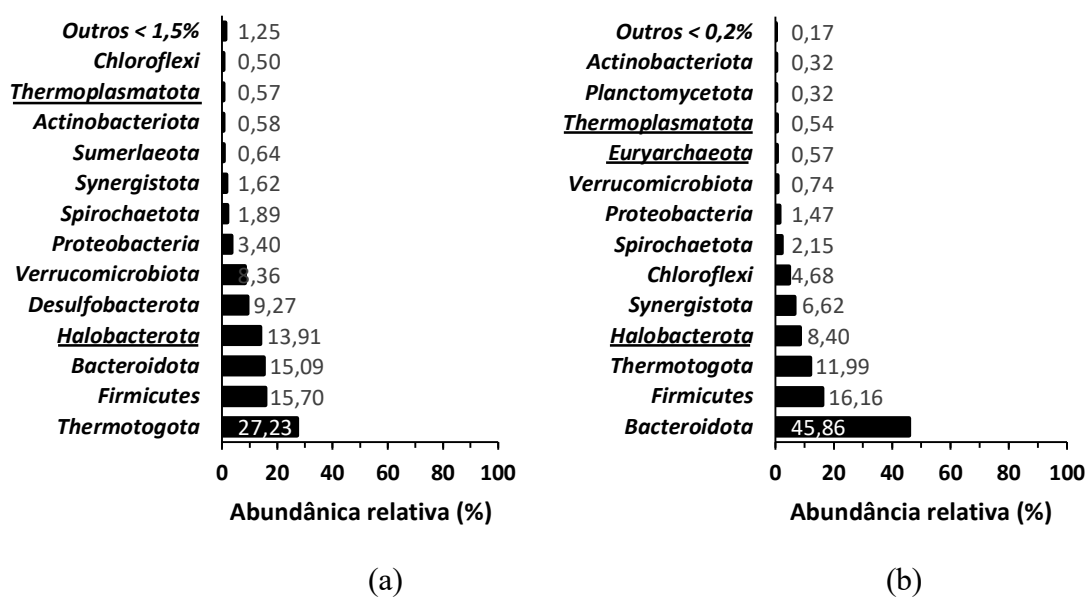
Em função dos dados mostrados, a presença de biomassa fúngica, inicialmente inoculada nos reatores hidrolíticos, foi capaz de provocar a alteração da comunidade bacteriana observada ao longo da operação dos reatores contínuos de fase ácida. Tais resultados expressam importantes avanços de conhecimento em função da falta de informações na literatura científica sobre o emprego de fungos, como células íntegras, em associação com bactérias e arqueias para o tratamento de águas residuárias. A maior diversidade de intermediários do processo fermentativo, como produto do metabolismo fúngico e bacteriano, fornece premissas para o estabelecimento e desenvolvimento de “outros microrganismos”, tornando-se uma estratégia potencial para a exploração da simbiose entre os microrganismos capaz de otimizar a remoção de carga orgânica e a formação de biogás pela digestão anaeróbia.

6.8.3. Avaliação do sequenciamento genômico para identificação das bactérias e arqueias presentes ao final da operação dos reatores contínuos metanogênicos

De forma análoga, as amostras referentes aos reatores metanogênicos

AnSTRBR1 e AnSTBR2, alimentados com AR bruta de laticínio (amostra 4) e com AR pré-tratada (amostra 6), respectivamente, foram sequenciadas para a caracterização dos microrganismos quanto aos filios do domínio *Bacteria* e *Archaea*, conforme mostra a Figura 65.

Figura 65 – Filios do domínio *Bacteria* e *Archaea* (sublinhado) identificados nas amostras ambientais dos reatores metanogênicos (a) AnSTBR1 alimentado com AR bruta de laticínio – amostra 4 e (b) AnSTBR2 alimentado com AR pré-tratada – amostra 6.



Ao final dos 137 dias de operação do reator metanogênico AnSTBR1, inoculado com lodo anaeróbico granular e alimentado com AR bruta, a abundância relativa do domínio *Bacteria* sobre o domínio *Archaea* foi de 85,26%. De acordo com a Figura 65.a, pertencentes ao domínio *Bacteria*, o filo *Thermotogota* foi o que apresentou a maior abundância relativa (27,23%), seguido do filo *Firmicutes* (15,70%) e *Bacteroidota* (15,09%). Juntos, os três filios representam mais de 55% de abundância relativa.

As bactérias do filo *Thermotogota* possuem morfologia na forma de bastonetes envoltas em uma membrana celular externa chamada de “toga”, são todas gram-negativas e anaeróbias, com diferentes tolerâncias a presença de oxigênio molecular (BHANDARI; GUPTA, 2014; BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2016). Os membros do filo *Thermotogota* possuem metabolismo heterotrófico, os quais são capazes de fermentar uma gama de substratos, principalmente a glicose e a xilose (REYSENBACH, 2015). Também são reportadas a capacidade de redução de enxofre elementar em sulfeto de hidrogênio (BRIONES et al., 2007). Os principais produtos da fermentação são o

ácido acético, o CO₂ e o H₂ (HUBER et al., 1986).

No presente estudo, o principal gênero do filo *Thermotogota* encontrado foi *AUTHM297 “uncultured”* com abundância relativa de 24,8%. Tais efeitos corroboram os resultados encontrados nos estudos de Ahmad (2017), Nesbo et al. (2006) e Briones et al. (2007), em condições mesofílicas, durante o tratamento anaeróbio de água residuária rica em sulfeto e na DA do bagaço da cana de açúcar pré-tratado hidrotermicamente. Nos estudos de Balk et al. (2002), é reportada a atividade sintrófica entre membros de *Thermotogales* com arqueias pertencentes a família de *Methanobacteriaceae*. A família *Methanobacteriaceae*, ordem *Methanobacteriales* e classe *Methanobacteria*, é constituída de quatro gêneros: *Methanobacterium*, *Methanosphaera*, *Methanobrevibacter* e *Methanothermobacter*, totalizando 49 espécies (OREN, 2014). A maioria das espécies da família de *Methanobacteriaceae* são arqueias anaeróbias estritas capazes de formar metano pela via hidrogenotrófica, assimilando CO₂ e H₂. Entretanto, algumas espécies podem reduzir o formato para formar metano, enquanto outras reduzem o metanol com H₂ para formar metano (*Methanosphaera*) (OREN, 2014). Para o reator metanogênico AnSTBR1, alimentado com AR bruta de laticínio, a abundância relativa das espécies da família *Methanobacteriaceae* representaram menos que 2% do total identificado para o domínio *Archaea*.

Pertencente ao filo de *Firmicutes*, o *Megasphaera* foi identificado com a maior abundância relativa (5,20%). Os membros de *Megasphaera* caracterizam-se por consumir lactato para produção de ácido acético, butirato e valerato (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). No filo de *Bacteroidota*, o gênero *Alistipes* foi quem apresentou a maior abundância relativa (8,67%). Entretanto, tal gênero foi descoberto nas últimas décadas, sendo bactérias anaeróbias encontradas na microbiota humana saudável do trato intestinal (PARKER et al., 2020). Outros gêneros identificados com abundância relativa significativa, mediante a operação do reator metanogênico AnSTBR1, foram os gêneros DEV114 “uncultured” (7,29%), pertencente ao filo de *Verrucomicrobia*, e *Lentimicrobium* (2,84%), pertencente ao filo de *Bacteroidota*.

Na ausência do pré-tratamento biológico da AR de laticínio, as maiores abundâncias relativas do domínio *Archaea* (AbRel = 14,74%) foram relacionadas com os filios *Halobacterota*, representada pelos gêneros de *Methanosaeta* e *Methanolinea*, apresentando abundância relativa de 8,20 e 4,80%, respectivamente. A *Methanosaeta* faz uso da via acetoclástica para a produção de metano. Dessa forma, o metano é formado através da clivagem do acetato em um grupo metil e CO. O CO é, então,

oxidado, atuando como doador de elétrons para redução do grupo metil a metano (PAVLOSTATHIS, 2011). Na via hidrogenotrófica, realizada pela arqueia *Methanolinea* entre outras arqueias (MADIGAN et al., 2016), a molécula de H₂ atua como doador de elétrons reduzindo a molécula de CO₂ em metano e água como produtos da etapa de metanogênese (PAVLOSTATHIS, 2011; PAVLOSTATHIS; GIRALDO-GOMEZ, 1991). Em tratamentos anaeróbios de AR, a via acetoclástica contribui em até 70% de todo o metano formado (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998). Assim, na presente pesquisa, a ausência de pré-tratamento da AR de laticínios induziram a formação de metano, majoritariamente pela via acetoclástica, apresentando, aproximadamente, dois terços da produção.

Bacteroidota (45,86%), seguido de *Firmicutes* (16,16%) e *Thermotogota* (11,99%), predominaram no reator metanogênico AnSTBR2, operado por 102 dias e alimentado AR pré-tratada (RHA1, RH2, RH3, RH4 e RH5). Os três filos juntos representaram 74,01% do total de filos caracterizados. A abundância relativa do domínio *Bacteria* em relação ao domínio *Archaea* para a amostra ambiental do reator metanogênico anaeróbio alimentado com AR pré-tratada nos reatores hidrolíticos/fermentativos (AnSTBR2) foi de 90,49%. Tal mudança observada nos perfis dos grânulos anaeróbios, tanto qualitativa como quantitativamente, estão diretamente associados com os intermediários (ácidos orgânicos) presentes no afluente pré-tratado e alimentado no reator metanogênico. Dessa forma, a presença da biomassa fúngica inoculada nos reatores de fase ácida, contribuiu positivamente para o tratamento da AR de laticínio.

No reator AnSTBR2, dentro do domínio *Bacteria*, os gêneros do filo *Bacteroidota* de maior predominância foram o *Lentimicrobium*, com abundância relativa de 16,55%, seguido de *Blvii28 wastewater-sludge* (10,75%), *Alistipes* (7,91%) e *S50 wastewater-sludge group* (5,10%). *Lentimicrobium* é caracterizado por bactérias mesofílicas, anaeróbias estritas, metabolismo quimiorganotrófico, imóveis e de crescimento lento (DUEHOLM et al., 2022; NIERYCHLO et al., 2020). Tais microrganismos apresentam atividade na fermentação de carboidratos e baixa assimilação de proteínas e ácidos graxos (SUN; TOYONAGA; OHASHI, 2016). *Blvii28 wastewater-sludge* abrange as bactérias anaeróbias estritas, fermentativas, com morfologia na forma de bastonetes retos. Os substratos utilizados na fermentação incluem os carboidratos, tais como a glucose, lactose, manose, maltose e outros, além de proteínas e ácidos orgânicos (DUEHOLM et al., 2022; SU et al., 2014). Segundo Su

et al. (2014), a assimilação de aminoácidos e ácidos orgânicos não são utilizados para crescimento. Dessa forma, a elevada concentração de carboidratos presentes na AR de laticínio corrobora a maior abundância relativa apresentada pelos microrganismos *Lentimicrobium* e *Blvii28 wastewater-sludge*. *S50 wastewater-sludge group* é reportado na degradação de glicerol para produção de ácidos orgânicos (NAKASAKI et al., 2020). He et al. (2022) atribuem o aumento da abundância relativa de *Blvii28 wastewater-sludge* e *S50 wastewater-sludge group* à DA de óleos e graxas com injeção de hidrogênio.

No filo *Firmicutes*, o único gênero com abundância relativa maior que 2% foi *Pelotomaculum* (10,46%). Em função da capacidade de oxidação do propionato, vários estudos relatam o sintrofismo estabelecido entre as bactérias de *Pelotomaculum* com arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (DE BOK et al., 2005; IMACHI et al., 2002; RAINEY, 2015). Tais efeitos são observados no presente estudo, visualizado pelo aumento da via hidrogenotrófica para formação de metano (Tabela 24) em comparação com a via acetoclástica. As bactérias do gênero *Pelotomaculum* são imóveis, possuem forma de bacilos retos ou ovalados, são anaeróbias estritas, mesofílicas ou termofílicas e o crescimento pode se dar por fermentação de ácidos orgânicos, álcoois primários, lactato e aromáticos de baixa massa molecular (RAINEY, 2015). O uso de compostos orgânicos, como o fumarato, como aceptores de elétrons alternativos são reportados (IMACHI et al., 2002). No terceiro filo com maior abundância relativa caracterizado no reator AnSTBR2 (*Thermotogota*), *AUTHM297 "uncultured"* foi o único gênero identificado.

De acordo com a Figura 65.b, o aumento da abundância relativa do domínio *Bacteria* pode ser explicado pela maior diversidade dos intermediários orgânicos, formados no pré-tratamento (fase ácida). Baixos valores de abundância relativa do domínio *Archaea*, em torno de 2%, foram encontrados no estudo da biodiversidade da comunidade microbiana presente na degradação anaeróbia termofílica do soro de leite para duas configurações de reatores CSTR (FONTANA et al., 2018). A Tabela 24 apresenta síntese dos filios, ordens e gêneros identificados e suas abundâncias relativas para as duas amostras analisadas no domínio *Archaea* (AnSTBR1 e AnSTBR2).

De acordo com a Tabela 24, em ambos os reatores metanogênicos, AnSTBR1 e AnSTBR2, o filo do domínio *Archaea Halobacterota* foi predominante, porém, a realização do pré-tratamento com *Penicillium citrinum* provocou queda da concentração dos representantes deste filo. Em contrapartida, pode ser observado aumento da

biodiversidade da comunidade metanogênica em relação aos gêneros observados na amostra ambiental do reator metanogênico alimentado com AR pré-tratada (AnSTBR2).

Para o reator metanogênico alimentado com AR pré-tratada (AnSTBR2), dentro do filo *Halobacterota*, a ordem *Methanosarcinales* foi representada pelos gêneros de *Methanosaeta* e *Methanosarcina*. Sem a realização do pré-tratamento hidrolítico (AnSTBR1), dentro da ordem *Methanosarcinales*, somente foi identificado a presença do gênero *Methanosaeta*. Em relação a ordem *Methanomicrobiales*, o gênero *Methanolinea* foi majoritário nos dois tipos de reatores, AnSTBR1 e AnSTBR2. A arqueia metanogênica *Methanosarcina* destaca-se pela sua versatilidade quando ao consumo de substrato para a produção de metano, uma vez que este gênero é capaz de realizar as três vias de produção de metano, hidrogenotrófica, acetoclástica e a assimilação de compostos que possuem grupos metil em sua estrutura (LOVLEY; KLUG, 1983; LIU; WHITMAN, 2008). O gênero *Methanosaeta* metaboliza o acetato com única fonte de energia, enquanto que o gênero *Methanolinea* é caracterizado por arqueias metanogênicas hidrogenotróficas (METCALF; EDDY, 2016; VON SPERLING, 1998).

Tabela 24 - Caracterização taxonômica em relação ao filo, ordem e gênero das amostras microbiológicas referentes aos reatores metanogênicos operados AnSTBR1 e AnSTBR2.

Reator	Filo; AbRel%	Ordem; AbRel%	Gênero; AbRel%	Principal via de produção de metano
AnSTBR1	<i>Euryarchaeota</i> ; 0,26	<i>Methanobacteriales</i> ; 0,18	<i>Methanobacterium</i> ; 0,18	Hidrogenotrófica *
		<i>Methanofastidiosales</i> ; 0,08	<i>Candidatus.Methanofastidiosum</i> ; 0,08	
	<i>Halobacterota</i> ; 13,91	<i>Methanomicrobiales</i> ; 5,70	<i>Methanolinea</i> ; 4,80	Hidrogenotrófica
		<i>Methanosarcinales</i> ; 8,21	<i>Methanoregula</i> ; 0,90 <i>Methanosaepta</i> ; 8,21	Hidrogenotrófica/acetoclástica Acetoclástica
AnSTBR2	<i>Thermoplasmatota</i> ; 0,57	<i>Methanomassiliicoccales</i> ; 0,57	<i>Candidatus Methanoplasma</i> ; 0,28 <i>Methanomassiliicoccus</i> ; 0,29	* Acetoclástica
		<i>Methanobacteriales</i> ; 0,49	<i>Methanobacterium</i> ; 0,27	Hidrogenotrófica
	<i>Euryarchaeota</i> ; 0,57	<i>Methanofastidiosales</i> ; 0,08	<i>Methanobrevibacter</i> ; 0,22 <i>Candidatus Methanofastidiosum</i> ; 0,08	Hidrogenotrófica *
		<i>Methanomicrobiales</i> ; 4,40	<i>Methanofollis</i> ; 0,08	Hidrogenotrófica
<i>Halobacterota</i> ; 8,40	<i>Methanosarcinales</i> ; 4,01	<i>Methanolinea</i> ; 2,95	Hidrogenotrófica	
		<i>Methanospirillum</i> ; 0,43 <i>Methanosaepta</i> ; 3,72 <i>Methanosarcina</i> ; 0,29	Hidrogenotrófica/acetoclástica Hidrogenotrófica Acetoclástica	
<i>Thermoplasmatota</i> ; 0,54	<i>Methanomassiliicoccales</i> ; 0,54	<i>Candidatus Methanoplasma</i> ; 0,04	* Hidrogenotrófica/acetoclástica	
		<i>Methanomassiliicoccus</i> ; 0,41 NA; 0,09	Acetoclástica *	

*não encontrado na literatura.

Nos estudos realizados por McATEER et al. (2020), durante as operações de reatores UASB com leito estruturado e AR de laticínios, sem pré-tratamento biológico, o gênero *Methanosaeta* foi quem apresentou a maior abundância relativa em relação as arqueias metanogênicas, corroborando os resultados desta pesquisa. Nos estudos das duas configurações de reatores CSTR (estágio único e duplo) realizados por Fontana et al. (2018), a maior biodiversidade da comunidade microbiana metanogênica foi encontrada no reator CSTR de duplo estágio, onde foram identificadas a presença de três classes dominantes, a *Methanobacteria* (38%), a *Methanomicrobia* (34%) e a *Thermoplasmata* (28%), correspondendo a uma população majoritária de três microrganismos metanogênicos igualmente abundantes, a *Methanothermobacter wolfeii*, *Methanosarcina thermophila* e a *Methanomassiliicoccus* sp. Segundo os autores, o melhor desempenho, em produção de metano, obtido pelo CSTR de duplo estágio pode ser atribuído à maior biodiversidade metanogênica presente nesta configuração de reator, uma vez que maior gama de metabólitos intermediários puderam ser convertidos em metano. No reator CSTR de estágio único, foi observada a dominância de apenas uma classe das arqueia metanogênica, a *Methanobacteria* (87%), o qual foi verificado a dominância da espécie *Methanothermobacter wolfeii*. Ainda, no reator de estágio único não foi constatada a presença de microrganismos metanogênicos acetoclásticos (FONTANA et al., 2018).

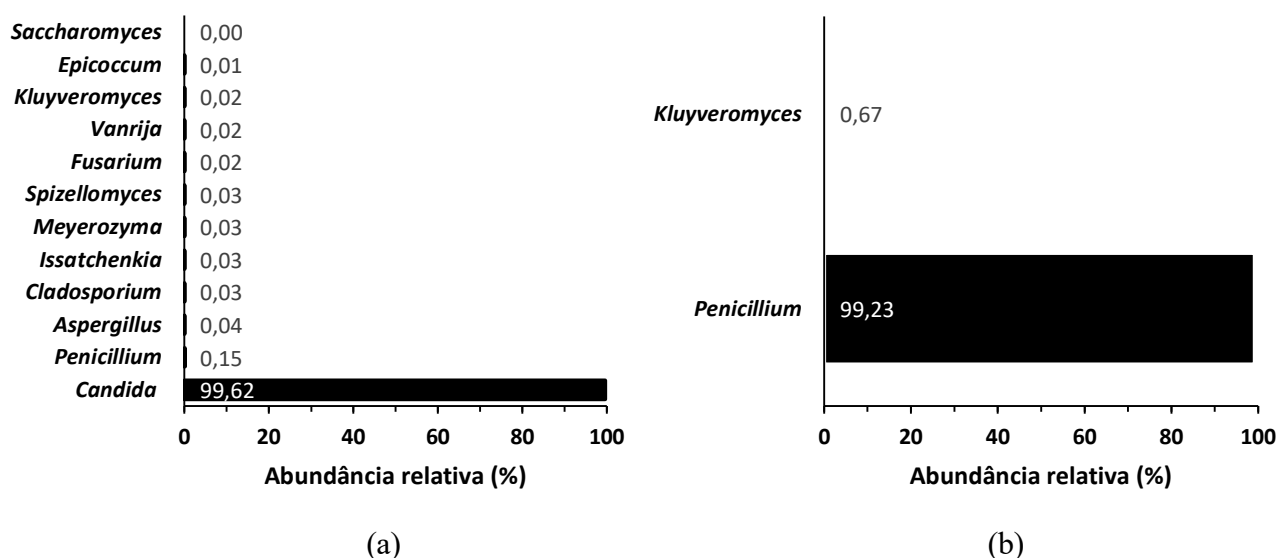
Lee et al. (2010) observaram que a comunidade microbiana metanogênica, no decorrer do processo de DA de água residuária do processamento de queijo em batelada, foi predominantemente composta por arqueia metanogênica acetoclástica *Methanosarcina* (*Methanosarcinaceae*) e a arqueia metanogênica hidrogenotrófica *Methanofollis* (*Methanomicrobiales*). Pagliano et al. (2019) destacaram que a abundância relativa entre as arqueias da *Methanoculles* atingiu 99% em comparação com o startup do processo de digestão anaeróbia, mostrando que o metano formado a partir da degradação da AR de laticínios se deu, primeiramente, pelo caminho hidrogenotrófico, assim como foi observado por Treu et al. (2019) para água residuária similar. Charalambous et al. (2019) destacaram a maior porcentagem de arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, principalmente *Methanolinea* em um reator batelada com recirculação interna, em escala plena (140 m³), por 91 dias, durante a DA da AR de laticínios.

Em função dos dados descritos e de acordo com a Tabela 24, observa-se que o

emprego do processo de pré-tratamento com células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, em reatores hidrolíticos/fermentativos, induziram ao aumento da biodiversidade metanogênica no reator AnSTBR2, acompanhado do incremento da via hidrogenotrófica de produção de metano. Tais resultados são consequências da utilização da AR de laticínios com elevada formação de ácidos orgânicos, durante a etapa de pré-tratamento, proporcionando condições adequadas para a estabilização e desenvolvimento de microrganismos metanogênicos diversos.

Para a caracterização da diversidade e a composição das comunidades fúngicas nos reatores metanogênicos, a região do RNA ribossômico ITS (*Internal Transcribed Spacer*) foi utilizada como um marcador *metabarcoding* de DNA. Tais regiões do ITS1 e ITS2 do gene do RNA ribossômico das amostras ambientais referentes aos reatores metanogênicos AnSTBR1 e AnSTBR2 foram amplificadas e sequenciadas. A Figura 66 apresenta a distribuição em relação ao gênero da amostra sequenciada do reator metanogênico AnSTBR1, alimentado com AR bruta de laticínio, e AnSTBR2, alimentado com AR pré-tratada.

Figura 66 – Representação da distribuição dos gêneros do domínio *fungi* sequenciados das amostras ambientais do reator metanogênico (a) AnSTBR1 e (b) AnSTBR2.



Na amostra do reator metanogênico alimentado com AR bruta de e de acordo com os dados sequenciados e publicados no serviço de bioinformática *Illumina*[®], foram encontradas abundâncias relativas de 99,95; 0,02 e 0,03%, para os filos de *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Chytridiomycota*, respectivamente. Para o reator AnSTBR2, alimentado com AR pré-tratada, 100% dos microrganismos sequenciados pertenciam ao

filo de *Ascomycota*.

Originalmente atribuído as espécies imperfeitas de leveduras e sem ciclo sexual conhecido (FITZPATRICK et al., 2010), o gênero *Candida* foi quem apresentou a maior abundância relativa durante a operação do reator metanogênico AnSTBR1. Tal gênero possui pouca informação sobre as relações evolutivas, abrangendo espécies de diversas origens, sexuais e assexuadas, com representantes patogênicos, patogênicos fracos e não patogênicos (BUTLER et al., 2009). No estudo do agrupamento de genes relacionados com as vias metabólicas observadas em espécies do gênero *Candida* e de acordo Fitzpatrick et al. (2010), existem 155 vias metabólicas reportadas e processadas manualmente por *Candida Genome Database*. A capacidade de oxidação de carboidratos em ácidos orgânicos é reportada nas pesquisas de Zhang et al. (2005) e Elmaleh, Defrance e Ghommidh (1999). Enquanto que a utilização do gênero *Candida* na oxidação de fenol e de proteínas são observados nos estudos de Amaral et al. (2012) e Lim, Kim e Hwang (2003), respectivamente.

Com a substituição da AR alimentada no reator metanogênico, passando de AR sem pré-tratamento (bruta) para AR pré-tratada, e ao final da operação do reator, a comunidade fúngica passa a ser totalmente composta do gênero *Penicillium* (Figura 66.b). Tal resultado evidencia o possível desenvolvimento da espécie *Penicillium citrinum*, inicialmente inoculada nos reatores hidrolíticos/fermentativos (pré-tratamento), no reator metanogênico, juntamente com as bactérias e arqueias metanogênicas. Alinhado às condições anaeróbias do reator metanogênico e a cinética fermentativa apresentada pelos reatores hidrolíticos/fermentativos (contínuos e em batelada) utilizados nesta pesquisa, a capacidade de fermentação, em anaerobiose, do gênero *Penicillium citrinum* é validada. Entretanto, pesquisas com a operação do reator metanogênico alimentado com AR pré-tratada, por células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum*, por longos períodos, superiores aos dias de operação desta pesquisa, devem ser realizadas para avaliação da possível predominância do domínio *Fungi* sobre o domínio *Bacteria/Archaea* (população clímax).

O gênero de *Penicillium* está entre os grupos mais abundantes de fungos na natureza, o qual é representado por 429 espécies validadas pela *International Commission on Penicillium and Aspergillus* (ICPA) (ASHTEKAR et al., 2021). Na literatura científica, são verificados a produção de vasta gama de metabólitos secundários por espécies do gênero, incluindo bioativos com atividade antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, anti-inflamatórias e outros, com importância econômica para

diversos setores industriais (ASHTEKAR et al., 2021). No tratamento de águas residuárias, é relatado o emprego do gênero *Penicillium* na biorremediação de metais (TAN; CHENG, 2003), LAS (COSTA; DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA JÚNIOR, 2020) e corantes (WANG; ZHANG; YAO, 2015). O emprego da biomassa fúngica, representada por células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum*, no pré-tratamento hidrolítico/fermentativo contínuo da AR de laticínio, tal como realizado nesta pesquisa, carece de informações disponíveis.

6.9. Avaliação hidrodinâmica dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos e metanogênicos

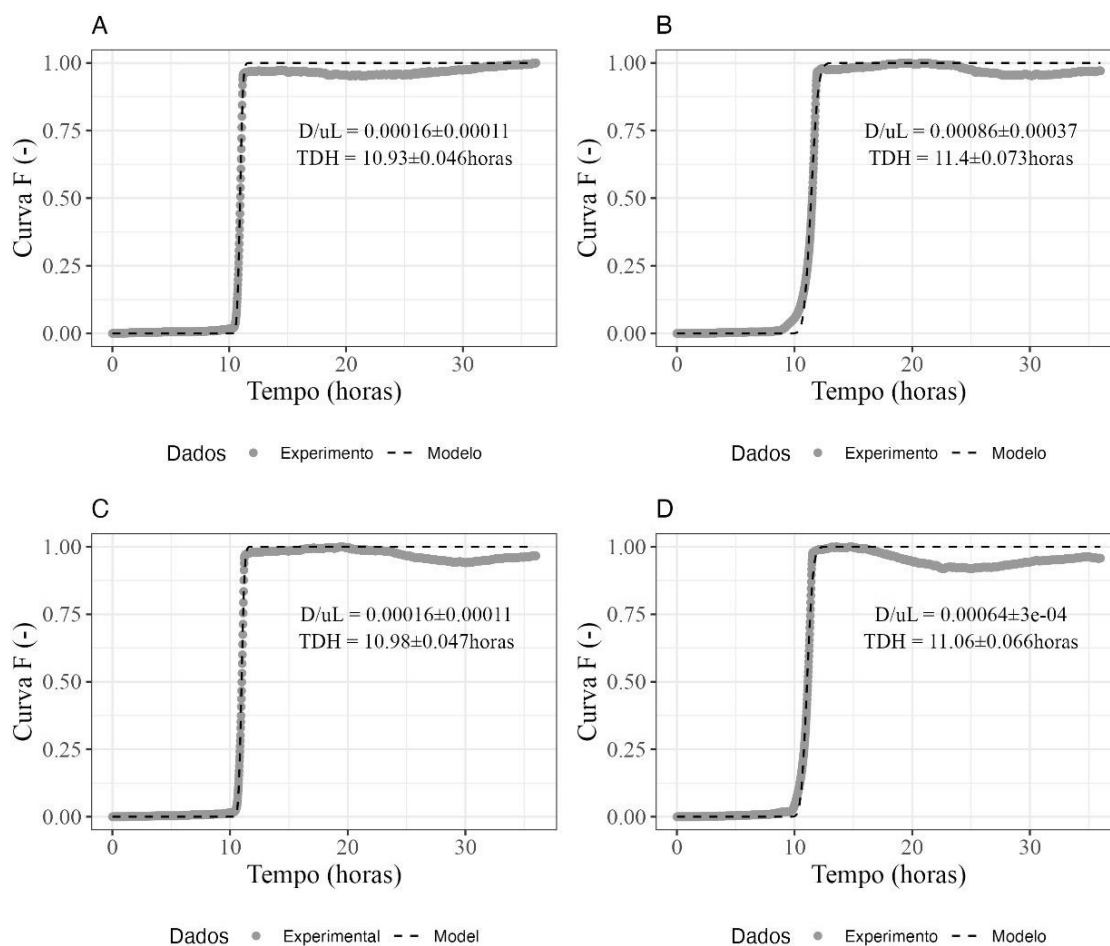
Ainda na Etapa 7, os reatores contínuos hidrolíticos e metanogênicos (Figura 9 e Tabela 9) foram submetidos à realização de ensaio hidrodinâmico, a fim de se avaliar o padrão do regime de escoamento e a determinação do TDH real apresentado por cada reator nas condições do ensaio experimental. Segundo Levenspiel (1999), o padrão de escoamento permite a determinação de um modelo que representa o desempenho global do sistema, tornando-se ferramenta importante para projeto, aumento de escala, simulação e otimização. Uma vez que os elementos de fluido, a nível molecular, podem percorrer diferentes rotas no interior dos reatores, o tempo de permanência pode ser diferente (BAILEY; OLLIS, 1986). Assim, a realização de ensaio hidrodinâmico possibilita a identificação de possíveis anomalias de escoamento, como a presença de zonas mortas, curto-circuito e caminhos preferenciais no interior dos reatores (LEVENSPIEL, 1999).

Baseando no modo de injeção de traçador do tipo degrau, os dados da concentração do traçador em função do tempo foram coletados e processados, conforme demanda os modelos analíticos propostos por Levenspiel (1999) e Danckwerts (1953).

6.9.1. Avaliação hidrodinâmica dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos

Referente à condição de reator contínuo hidrolítico/fermentativo, a Figura 67 apresenta a curva F obtida, comparando o ajuste do modelo analítico do padrão de escoamento (Sigmóide de Gompertz) com os dados experimentais dos ensaios hidrodinâmicos abióticos realizados. Também, são mostrados os números de dispersão calculados (D/u.L) e os valores de TDH real (experimental) para cada condição avaliada.

Figura 67 – Curva resposta tipo F do reator hidrolítico/fermentativo (a) RH1 com biomassa livre – RH1.CBL; (b) RH1 com leito estruturado - RH1.CLE; (c) RH2 com biomassa livre - RH2.CBL e (d) RH2 com leito estruturado – RH2.CLE.



Por meio da Figura 67, verifica-se que em todos os sistemas avaliados, o ajuste dos dados experimentais à Sigmóide de Gompertz foram adequados. Tal consideração se deu pelo elevado valor do coeficiente de correlação (r^2) obtido para o ajuste, sendo superior a 0,96 em todas as condições. Pelo formato da curva F, todas as configurações experimentais levaram ao padrão de escoamento próximo ao escoamento tubular ideal (pistonado) (DANCKERTZ, 1995). Deste modo, a presença de leito estruturado ao longo do volume útil dos reatores hidrolíticos/fermentativos pouco influenciou no padrão de escoamento identificado.

Para a melhor representação dos desvios de idealidade dos reatores contínuos hidrolíticos/fermentativos e em função do escoamento tender ao tubular ideal, pode-se aplicar o modelo simples e uniparamétrico de dispersão longitudinal (ou axial

dependendo da posição do reator e direção de escoamento). Neste contexto, na idealidade do escoamento pistonado, não há dispersão alguma no sentido longitudinal e quanto maior a dispersão, mais o modelo se distancia do tubular ideal (LEVENSPIEL, 1999; TORRES; OLIVEIRA, 1998). Tal modelo de dispersão longitudinal representa adequadamente o escoamento de reatores que se aproximam do tubular ideal, como reatores de leito fixo estruturado e reatores com elevadas relações de comprimento por diâmetro (LEVENSPIEL, 1999).

A dispersão longitudinal é calculada pelo parâmetro “D”, também conhecido como coeficiente de dispersão e representa o quanto o escoamento se afasta da idealidade. O parâmetro adimensional do número de dispersão ($\frac{D}{u.L}$) mede a extensão da dispersão longitudinal, para valores tendendo a zero o escoamento tende ao tubular ideal, para valores tendendo ao infinito o escoamento tende a mistura perfeita (LEVENSPIEL, 1999). No modelo proposto por Levenspiel (1999), a dispersão é de pequena intensidade para valores do número de dispersão ($\frac{D}{u.L}$) menores que 0,01, valores maiores são referentes às dispersões de grandes intensidades.

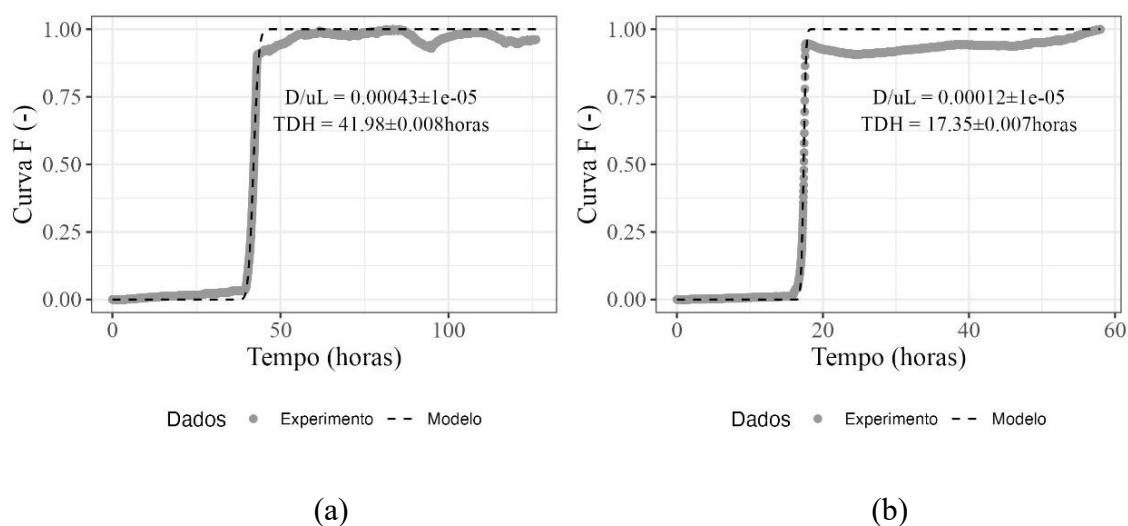
O número de dispersão (D/u.L) calculado (Figura 67) valida a utilização do modelo de Danckwartz como ferramenta hidrodinâmica para a avaliação do padrão de escoamento no interior dos reatores hidrolíticos/fermentativos, aplicável para pequenos números de dispersão ($D/u.L < 0,1$) (DANCKWERTS, 1953; DAMASCENO, 2008).

Em relação aos valores de TDH observados, o maior desvio do valor do TDH experimental calculado em relação ao valor de TDH teórico projetado (12h) foi para a condição RH1.CBL (8,9% menor). Entretanto, o resultado encontrado é pouco expressivo e minimiza a possível existência de anomalias de escoamento como curto-circuito, caminhos preferenciais e zonas mortas ao longo no volume útil do reator de fase ácida (DANCKWERTS, 1953; LEVENSPIEL, 1999). Valores diferentes do TDH experimental em relação ao teórico, também, foram encontrados nos estudos de Damasceno (2008). Segundo o autor, tal divergência indicou que o volume da fase líquida inicialmente adotada não foi adequada. Para a utilização do mesmo reator, o confinamento da biomassa no leito estruturado conduziu a um pequeno aumento do valor de TDH observado (Figura 67), entretanto menor que 04% para os dois reatores hidrolíticos utilizados nesta pesquisa.

6.9.2. Avaliação hidrodinâmica dos reatores contínuos metanogênicos

De forma análoga ao ensaio hidrodinâmico realizado para a identificação do padrão de escoamento dos reatores hidrolíticos, anomalias de escoamento e determinação do TDH real de operação, a Figura 68 apresenta a curva F, o número de dispersão calculado ($D/u.L$) e o valor de TDH experimental para a condição de operação do reator metanogênico AnSTBR1 e AnSTBR2.

Figura 68 – Curva resposta tipo F dos reatores metanogênicos operados com AR de laticínio (a) bruta – AnSTBR1 e (b) com AR pré-tratada – AnSTBR2.



De acordo com as Figura 68 e objetivando-se a redução do valor do TDH, mantendo-se constante a COV afluyente ($5,0 - 7,0 \text{ kg/m}^3.\text{dia}$), o padrão de escoamento no reator metanogênico não foi limitado pelo aumento da vazão de escoamento afluyente aplicado. Ambas as configurações (AnSTBR1 e AnSTBR2) apresentaram regime de escoamento característico do tubular ideal. A idealidade de escoamento nas duas condições de operação do reator metanogênico, também, foram confirmadas pelo modelo de dispersão longitudinal proposto por Danckwerts (1953). De acordo com os valores apresentados para o número de dispersão ($D/u.L$), tanto a configuração AnSTBR1 como a AnSTBR2 se enquadraram como dispersão de pequena intensidade, característico do escoamento tubular ideal (próximo de zero) (DANCKWERTS, 1953; LEVENPIEL, 1999).

Diferentemente ao que foi observado nesta pesquisa, em resposta ao aumento da

velocidade de escoamento para a diminuição do TDH operacional, o aumento do grau de mistura foi relatado nos estudos hidrodinâmicos de Kramers e Alberta (1953) e nos estudos de Damasceno (2008). Segundo os autores, a maior velocidade de escoamento apresentou tendência no aumento da dispersão no sistema, para um mesmo comprimento e volume de reator. Dessa forma, o incremento do número de dispersão (D/u.L) foi visualizado como consequência do aumento da velocidade de escoamento.

O ajuste do modelo hidrodinâmico representado pela Sigmóide de Gompertz aos dados experimentais, para a curva F gerada, foram adequados em virtude dos elevados valores de correlação obtidos. Tais resultados expressam a eficiência de aplicação do modelo ajustado de Gompertz para a obtenção das curvas hidrodinâmicas normalizada (curva F) e diferenciada (tipo E). O valor de TDH experimental calculado para o reator metanogênico AnSTBR1 foi exatamente igual ao valor teórico de projeto (42 horas). Fato este não observado para o reator metanogênico AnSTBR2, onde o valor de TDH experimental calculado foi 13,25% menor que o valor do TDH teórico (20 horas). Ademais, não foram identificadas anomalias de escoamento para as duas configurações do reator metanogênico AnSTBR1 e AnSTBR2.

7. CONCLUSÕES

Na etapa de separação do meio líquido sintético, pós cultivo celular, a ausência de compactação das células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* induziu ao aumento da atividade enzimática, além de ser observada a melhor distribuição da biomassa fúngica pelo volume útil dos reatores contínuos hidrolíticos. As lipases sintetizadas pelas células íntegras se mostraram ativas e dispensaram etapas de extração e purificação de enzimas.

Os ensaios cinéticos de biodegradação da AR de laticínio, em batelada, forneceram indícios de que as células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* apresentaram atividade fermentativa na ausência de oxigênio molecular e reposição das enzimas hidrolíticas sintetizadas, inicialmente, durante o cultivo celular sob agitação submersa. Para o tempo de meia vida e a constante de desativação enzimática calculados, concentração conhecida de enzimas inoculadas e o tempo dos ensaios realizados, tais conclusões se deram a partir das elevadas concentrações de dióxido de carbono e ácidos orgânicos produzidos, alterações dos perfis cinéticos dos constituintes da AR de laticínio (carboidratos, proteínas e lipídeos) e baixa bioconversão da matéria orgânica.

Os reatores contínuos hidrolíticos, inoculados com células íntegras fúngicas, apresentaram desempenho característico de reatores de fase ácida, com maior teor de acidez nos reatores hidrolíticos com topo fechado para a atmosfera externa. A inoculação de 22500U apresentou desempenho similar a 7500U para mesma carga orgânica aplicada ao reator, indicando possível limitação por substrato. Por meio do sequenciamento genômico, pode-se observar que a presença de células íntegras do fungo filamentoso *P. citrinum* influenciaram na produção de ácidos orgânicos e alterações da comunidade microbiana.

Ao avaliar os efeitos do pré-tratamento biológico (hidrólise fúngica) na digestão anaeróbia, a operação do reator AnSTBR com água residuária pré-tratada, sob mesma carga orgânica volumétrica e razão de alcalinizante, resultou na melhor remoção de DQO, geração de biogás de melhor qualidade (maior concentração de metano) e redução do tempo necessário ao tratamento anaeróbio. Tais efeitos representam importantes avanços em termos de custo, área disponível e capacidade de tratamento.

O perfil de escoamento pistonado foi identificado, via ensaio hidrodinâmico, nos reatores hidrolíticos (pré-tratamento biológico) e metanogênicos (AnSTBR), para todas

as etapas de operação.

O método cromatográfico adaptado e a extração dos lipídeos presentes na água residuária com a mistura de Clorofórmio e Metanol (2:1) se mostraram adequados para o monitoramento do processo hidrolítico, juntamente com a determinação do teor de acidez e concentração de glicerol como produto da hidrólise de lipídeos.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a realização de trabalhos futuros, são recomendadas as seguintes sugestões:

- Compra e seleção de padrões internos referentes aos triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos de cadeia longa, representantes dos lipídeos presentes na AR de laticínios, para inclusão quali-quantitativa no método cromatográfico adaptado;
- Avaliação de desempenho do pré-tratamento biológico da AR de laticínio, com células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum*, na etapa de metanogênese, empregando cargas orgânicas volumétricas superiores ao desta pesquisa;
- Avaliação da predominância do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* no reator metanogênico, sob longos períodos de operação, determinando sua influência sobre a comunidade bacteriana e metanogênica;
- Uso de outras cepas de fungos filamentosos para a realização do pré-tratamento enzimático da AR de laticínio e emprego de outros tipos de efluentes com elevados teores de gorduras, como o efluente de curtume, produção de sorvetes e etc.

REFERÊNCIAS

- AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.
- ADULKAR, T.V.; RATHOD, V.K. Ultrasound assisted enzymatic pre-treatment of high fat content dairy wastewater. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 1083–1089, 2014.
- AHMAD, F. **Produção de metano em reposta ao pré-tratamento hidrotérmico com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio do bagaço de cana-de-açúcar**. 2017. 224 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- AHMAD, T.; AADIL, R. M.; AHMED, H. et al. Treatment and utilization of dairy industrial waste: a review. **Trends Food Sci Technol.**, 88, p.361–372, 2019.
- AKUZAWA, M.; HORI, T.; HARUTA, S.; UENO, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Distinctive responses of metabolically active microbiota to acidification in a thermophilic anaerobic digester. **Microb. Ecol.**, v.61, p.595-605, 2011.
- ALVES, A. M. **Enzymatic pretreatment of lipid-rich wastewater using lipolytic whole cells**. 2018. 82 f. Dissertation (Master's degree in Chemical Engineering), Federal University of Alfenas, UNIFAL, Poços de Caldas/MG, 2018.
- ALVES, A. M.; DE MOURA, R. B.; CARVALHO, A. K. F.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Penicillium citrinum whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. **Biomass & Bioenergy**, v. 120, p.433-438, 2019.
- ALVES, M. M.; PEREIRA, M. A.; SOUSA, D. Z. et al. Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). **Microb Biotechnol**, 2, p.538–550, 2009.
- AMARAL, C.; LUCAS, M. S.; SAMPAIO, A.; PERES, J. A.; DIA, A. A.; PEIXOTO, F.; ANJOS, M. R.; PAIS, C. Biodegradation of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 68, p. 45-50, 2012.
- AN, S.; GARDNER, W. S. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) as a nitrogen link, versus denitrification as a sink in a shallow estuary (Laguna Madre/Baffin Bay, Texas). **Mar Ecol Prog Ser**, v.237, p.41–50, 2002.
- ANDRADE, G. S. S. et al. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.37, n. 12, p. 2539 2548, 2014.
- ANDRADE, G. S. S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183-188, 2012.

ANDRADE, M. V. F. **Influência do tempo de detenção hidráulica e das condições nutricionais na remoção de surfactante aniônico de água residuária de lavanderia e seus efeitos na comunidade microbiana**. 2016. 200 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

ANTONIASSI, R.; GAMA, M. A. S.; WILHELM, A. E.; MACHADO, A. F. de F.; GUEDES, A. M. M.; BIZZO, H. R. Interferência de solventes utilizados na extração da gordura do leite na determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. In: Encontro Nacional, 20.; Congresso Latino Americano De Analistas De Alimentos, 6., 2017. Belém. Segurança e qualidade de alimentos. Belém, PA: LACEN: UFPA, 2017. p. 1-6, 2017.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 22^a Edition. Washington, D.C, APHA, 2012.

ARAÚJO, M. E. M. B. et al. Synthesis of structured triacylglycerols enriched in n-3 fatty acids by immobilized microbial lipase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1016-1013, 2016.

ARIKAN, O. Effect of temperature on methane production from field-scale anaerobic digesters treating dairy manure. In: Waste to worth: spreading science and solutions. Seattle, WA. March 31-April 3, 2015.

ARIUNBAATAR, J.; PANICO, A.; ESPOSITO, G.; PIROZZI, F.; LENS, P. N. L. Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. **Appl. Energy**, v.123, p.143–156, 2014.

ARUNADEVI, P. S.; SARAVANARAJA, M. Two phase upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor on the reduction of chemical oxygen demand in dairy effluent. **Asian J Adv Res**, 3, p.15–23, 2020.

ASHTEKAR, N.; ANAND, G.; THULASIRAM, H. V.; RAJESHKUMAR, K. C. Chapter 14 - Genus *Penicillium*: Advances and application in the modern era. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, **Recent Advances in Application of Fungi and Fungal Metabolites: Current Aspects**, p.201-213, 2021.

ASTALS, S.; NOLLA-ARDÈVOLB, V.; MATA-ALVAREZA, J. Thermophilic codigestion of pig manure and crude glycerol: Process performance and digestate stability. **Journal of Biotechnology**, v.166, n.3, p.97 - 104. 2013.

ATHANASOULIA, E.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Co-digestion of sewage sludge and crude glycerol from biodiesel production. **Renewable Energy**, v.62, p.73-78. 2014.

AVELLA, A. C. et al. Fungal Treatment for Wastewater Settleability. **Environmental Engineering Science**, v.31, n.1, 2014.

AYABE, D. N. **Co-digestão anaeróbia de glicerol residual com esgoto sanitário visando o aumento da produção de metano**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2018.

AZMAN, S. **Anaerobic Digestion of Cellulose and Hemicellulose in the Presence of Humic Acids**. Wageningen University: Wageningen, The Netherlands, 2016.

BALK, M.; WEIJMA, J.; STAMS, A. J. *Thermotoga lettingae* sp. nov., a novel thermophilic, methanoldegrading bacterium isolated from a thermophilic anaerobic reactor. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, n. Pt 4, p. 1361-8, Jul 2002. ISSN 1466-5026

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

BARBER, W.P.F. Thermal hydrolysis for sewage treatment: A critical review. **Water Res.**, v.104, p.53–71, 2016.

BARBOSA, M. Y. U.; ALVES, I.; DEL NERY, V.; SAKAMOTO, I. K.; POZZI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Methane production in a UASB reactor from sugarcane vinasse: shutdown or exchanging substrate for molasses during the off-season? **Journal of Water Process Engineering**, 47, 102664, 2022.

BELAY, N.; SPARLING, R.; DANIELS, L. Relationship of formate to growth and methanogenesis by *Methanococcus thermolithotrophicus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.52, p.1080–1085, 1986.

BELITZ, H.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Sugars, sugar alcohols and honey. In: *Food chemistry*. Berlin Heidelberg, Springer Verlag, p 498–545, 2009.

BELLA, K., RAO, P. V. Anaerobic digestion of dairy wastewater: effect of different parameters and co-digestion options—a review. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiol. Rev.**, v.70, p.567–590, 1990.

BHANDARI, V.; GUPTA, R. S. The Phylum Thermotogae. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F., et al (Ed.). *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p.989-1015. ISBN 978-3-642-38954-2.

BHARATI, M.; SHETE, S.; SHINKAR, N. P. Anaerobic Digestion of dairy industry waste water-biogas evolution-a review. **Int J Appl Environ Sci.**, 12, p.1117–1130, 2017.

BIROLI, W. G., DA SILVA, B. F., RODRIGUES-FILHO, E. Biodegradation of the fungicide Pyraclostrobin by bacteria from orange cultivation plots. **Science of The Total Environment**, 746, 140968, 2020.

BIRWAL, P. D. G.; PRIYANKA, S. P. S. Advanced technologies for dairy effluent treatment Abstract. **J Food,Nutr Popul Heal.**, 1, p.3–7, 2017.

BLACK, J. G. **Microbiologia: Fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro,

Guanabara Koogan, 2002. 829p.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v.37, 911-7, 1959.

BOCHMANN, G.; HERFELLNER, T.; SUSANTO, F.; KREUTER, F.; PESTA, G. Application of enzymes in anaerobic digestion. **Water Sci. Technol.**, v.56, p.29–35, 2007.

BOHN, I.; BJÖRNSSON, L.; MATTIASSON, B. Effect of temperature decrease on the microbial population and process performance of a mesophilic anaerobic bioreactor. **Environ Technol.**, 28, p.943–952, 2007.

BONASTRE, N.; PARIS, J.M. Survey of laboratory, pilot and industrial anaerobic filter installations. **Proc. Biochem.**, 24, p.15 – 20, 1989.

BORGES, A.V. **Mesophilic co-digestion of sugarcane vinasse and distilled glycerol in a structured-bed reactor**. 2020. 137 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

BRANCO, S. M. **Viagem ao mundo dos micróbios**. 3ª ed. reformulada. São Paulo: Moderna, 2011.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd New York: Ed. Springer, 2005.

BRIONES, A. M. et al. Microbial diversity and dynamics in multi- and single-compartment anaerobic bioreactors processing sulfate-rich waste streams. **Environ Microbiol**, v. 9, n. 1, p. 93-106, Jan 2007. ISSN 1462-2912

BRITZ, J. T.; VAN SCALWYK, C.; HUNG, Y. T. Treatment of dairy processing wastewaters. In: WANG, L. K., HUNG, Y. T.; LO, H. H.; YAPIJAKIS, C., editors. **Waste treatment in the food processing industry**. USA: CRC Press, p.1-25, 2006.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T. **Biology of Microorganisms**, 6ª ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1991.

BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Lipases, B. Borgstrom and H.L. Brockman, **Elsevier (eds.)**, Amsterdam, p. 3-46, 1984.

BRUNOZI JÚNIOR, A. C.; ABRANTES, L. A.; FERREIRA, M. A. M.; GOMES, A. P. Mercado e Tributação: Uma Abordagem Teórica sob a Perspectiva de Estruturas de Mercado na Cadeia Agroindustrial do Leite. **Revista Econômica do Nordeste**, v.43, n.1, p.93-108, 2012.

BUTLER, G. et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, 4; 459 (7247), p.657-62, 2009.

BYLUND, G. Dairy processing handbook. Serbian translation of handbook by Tetra

Pak Processing System AB, Lund (Sweden), 2003.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G. A.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 19, p. 1591-1595, 2001.

CAMPOS, C. M. M.; CARMO, F. R.; BOTELHO, C. G. COSTA, C. C. Development and operation of the upflow anaerobic sludge blanked reactor treating liquid effluent from swine manure in laboratory scale. **Revista Ciências e Agroecologia**, v.30, p. 140-147, 2006.

CANALES, A.; PAREILLEUX, A.; ROLS, J. L.; GOMA, G.; HUYARD, A. Decreased sludge production strategy for domestic treatment. **Water Sci. Technol.**, 30, 97 - 116, 1994.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. De; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biociência e Desenvolvimento**, ano 9, p. 48-57, 2006.

CÁNOVAS-DIAZ, M.; HOWELL, J.A. Down-flow anaerobic filter stability studies with different reactor working volumes. **Proc. Biochem.**, 22, p.181 - 184, 1987.

CARDOSO, L. G. V.; BARCELOS, M. DE F. P.; DE OLIVEIRA, A. F.; PEREIRA, J. DE A. R.; DE ABREU, W. C.; PIMENTEL, F. DE A.; CARDOSO, M. DAS G.; PEREIRA, M. C. DE A. Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais-Brasil. **Seminário: Ciências Agrárias**, 31, 1, pp. 127-135, 2010. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J. L. A.; DALLA SANTA, H. S.; ALVAREZ, D. C.; TERRA, N. N.; DALLA SANTA, O. R. Proteolytic and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal sausages. **Ambiência Guarapuava (PR)**, v. 6, n. 1, p.125 - 132, 2010.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

CERQUEIRA, V. S.; HOLLENBACH, E. B.; MABONI, F.; CAMARGO, F. A.; PERALBA, M. D. C. R.; BENTO, F. M. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemicals residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p.1203-1222, 2012.

CHARALAMBOUS, P., SHIN, J., SHIN, S.G., VYRIDES, I. Anaerobic digestion of industrial dairy wastewater and cheese whey: Performance of internal circulation

bioreactor and laboratory batch test at pH 5-6. **Renew. Energy**, 147, p.1-10, 2019.

CHEAH, Y.; VIDAL-ANTICH, C.; DOSTA, J. Volatile fatty acid production from mesophilic acidogenic fermentation of organic fraction of municipal solid waste and food waste under acidic and alkaline pH. **Adv Prospect F Waste Manag.**, 26, 2019.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: reatores anaeróbios**. 2.ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, v.5, 379p, 2007.

CHU, C. P.; LEE, D. J.; CHANG, B. V.; YOU, C. S.; TAY, J. H. “Weak” ultrasonic pretreatment on anaerobic digestion of flocculated activated biosolids. **Water Res.**, v.36, p.2681–2688, 2002.

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

CONRAD, R. Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. **Advances in Agronomy**, v.96, n.7, p. 1-63, 2007.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S.S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química nova**, v. 40, n.1, p. 85-96, 2016.

COSTA, L. V. C. **Biodigestão anaeróbia da cama de frango associada ou não ao biofertilizante obtido com dejetos de suínos: produção de biogás e qualidade do biofertilizante**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

COSTA, M. F.; DE OLIVEIRA, A. M.; DE OLIVEIRA JUNIOR, E. N. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by *Penicillium chrysogenum*. **Bioresource Technology**, v.9, 100363, 2020.

COTTA-NAVARRO, C. B.; CARILLO-REYES, J.; VAZQUEZ, G. D. Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. **Water Sci Technol.**, 64, p.367–375, 2011.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

CUI, Y. Q.; OKKERSE, W. J.; LANS, R. G. J. M. VAN DER; LUYBEAN, K. C. A. M. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations. **Biotechnology and bioengineering**, v.2, p.216-229, 1998.

DA SILVA, C; SILVA, S. B. Avaliação de solventes e condições experimentais para extração do óleo de sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus L.*). **Engevista**, V. 18, n. 2, p. 348-362, 2016.

DAMASCENO, L. H. S. **Degradação do aldicarbe em biorreator anaeróbio horizontal de leito fixo**. 2008. 161f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São

Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

DANCKWERTS, P. W. Continuous flow systems: Distribution of residence times. **Chemical Engineering Science**, 2(1), p.1-13, 1953.

DE BOK, F. A. M.; HARMSSEN, H. J. M.; PLUGGE, C. M.; DE VRIES, M. C.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M.; STAMS, A. J. M. The first true obligately syntrophic propionate oxidizing bacterium, *Pelotomaculum schinkii* sp. nov., co-cultured with *Methanospirillum hungatei*, and emended description of the genus *Pelotomaculum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 55(4), 1697 – 1703, 2005.

DEBOWSKI, M., ZIELIŃSKI, M., KISIELEWSKA, M., KAZIMIEROWICZ, J. Evaluation of anaerobic digestion of dairy wastewater in an innovative multi-section horizontal flow reactor. **Energies**, 13, 2392, 2020.

DE VRIEZE, J.; HENNEBEL, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Methanosarcina: the rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation. **Bioresour. Technol.**, v.112, p.1–9, 2012.

DELFORNO, T. P.; MOURA, A. G. L.; OKADA, D. Y.; SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Microbial diversity and the implications of sulfide levels in an anaerobic reactor used to remove an anionic surfactant from laundry wastewater. **Bioresour. Technol.**, v.192, p. 37-45, 2015.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O. Anaerobic acidogenesis of dairy wastewater: the effects of variations in hydraulic retention with no pH control. **J Chem Technol Biotechnol.**, 79, (7), p.755–760, 2004.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O. Changes in microbial ecology in an anaerobic reactor. **Bioresour. Technol.**, 97, p.1201–1208, 2006.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T. T. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. **Process Biochem.**, 40, p.2583–2595, 2005.

DEMIRER, G. N.; CHEN, S. Effect of retention time and organic loading rate on anaerobic acidification and biogasification of dairy manure. **J Chem Technol Biotechnol.**, 79, p.1381–1387, 2004.

DEUBLEIN, D.; STEINHAUSER, A. **Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction**. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2008; ISBN 978-3-527-31841-4.

DILALLO, R.; ALBERTSON, O. R. Volatile acids by Direct Titration. **Journal Water Pollution Control Federation**, v.23, n.4, p.353-365, 1961.

DINOPOULOU, G.; RUDD, T.; LESTER, J. N. Anaerobic acidogenesis of a complex wastewater: II. Kinetics of Growth, Inhibition, and Product Formation. **Biotechnology and Bioengineering**. v.31, p.958-968, 1988a.

DINOPOULOU, G.; STERRITT, R. M.; LESTER, J. N. Anaerobic acidogenesis of a

complex wastewater: I. The influence of operational parameters on reactor performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.969-978, 1988b.

DOBLE, M.; KUMAR, A. Treatment of waste from food and dairy industries. In: **Biotreatment of industrial effluents**. Burlington, VT, USA: Elsevier Butterworth-Heinemann, p.183–5, 2005.

DOMINGOS, J. M. et al. Effect of Operational Parameters in the Continuous Anaerobic Fermentation of Cheese Whey on Titters, Yields, Productivities, and Microbial Community Structures. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, 5, 2, p.1400 – 1407, 2016.

DOMINGUES, R. F.; SANCHES, T.; SILVA, G. S.; BUENO, B. E.; RIBEIRO, R.; KAMIMURA, E. S.; FRANZOLIN NETO, R.; TOMMASO, G. Effect of enzymatic pretreatment on the anaerobic digestion of milk fat for biogas production. **Food Research International**, v. 73, p. 26–30, 2015.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

DUEHOLM, M.S., NIERYCHLO, M., ANDERSEN, K.S., RUDKJØBING, V., KNUDSEN, S. The MiDAS Global Consortium, ALBERTSEN, M., NIELSEN, P.H. MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. **Nat Commun**. 13, p.1908, 2021.

DUGBA, P. N.; ZHANG, R. Treatment of dairy wastewater with two-stage anaerobic sequencing batch reactor systems – thermophilic versus mesophilic operations. **Bioresour Technol.**, v.68, p.225-33, 1999.

DUONG, T. H., GROLLE, K., NGA, T. T. V., ZEEMAN, G., TEMMINK, H., VAN EEKERT, M. Protein hydrolysis and fermentation under methanogenic and acidifying conditions. **Biotechnology for Biofuels**, 12, 1, 2019.

DWYER, J.; STARRENBURG, D.; TAIT, S.; BARR, K.; BATSTONE, D.J.; LANT, P. Decreasing activated sludge thermal hydrolysis temperature reduces product colour, without decreasing degradability. **Water Res.**, v.42, p.4699–4709, 2008.

ELMALEH, S.; DEFRANCE, M. B.; GHOMMIDH, C. Organic acids oxidation by *Candida utilis*: application to industrial waste water treatment. v. 35, 5, p.441-449, 1999.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **ANUÁRIO Leite 2022: pecuária leiteira de precisão**. ICPLeite/Embrapa. Juiz de Fora, MG, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>. Acesso em: 02 ago. 2022.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **O mercado de leite em 2017** – ICPLeite/Embrapa. Juiz de Fora, MG, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1096685/o-mercado-de-leite-em-2017>>. Acesso em: 30 dez. 2018.

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

EVANS, P. N. et al. Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. **Science**, v.350, n.6259, p.434-437, 2015.

EVERETT, J. G. Dewatering of wastewater sludge by heat treatment. **J. Water Pollut. Control Fed.**, v.44, p.92-100, 1972.

FARIZOGLU, B.; KESKINLER, B.; YILDIZ, E.; NUHOGLU, A. Simultaneous removal of C, N, P from cheese whey by jet loop membrane bioreactor (JLMBR). **J Hazard Mater**, v. 146, p.399-407, 2007.

FERNANDES, A. **Água residuária de laticínios em co-digestão com dejetos de bovinos leiteiros**. 2016. 63f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, campus de Botucatu, 2016.

FERNÁNDEZ, C., CUETOS, M. J., MARTÍNEZ, E. J., GÓMEZ, X. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production. **Biomass and Bioenergy**, 81, p.55-62, 2015.

FERREIRA, M. A. M.; ABRANTES, L. A.; PEREZ, R. Investigation of strategic groups in the industry of dairy products by multivariate approach. **RAM - Revista de Administração Mackenzie**, V.9, n.2, p.152-172, 2008.

FERREIRA, M. A. M.; ABRANTES, L. A.; PEREZ, R. Investigação de grupos estratégicos na indústria de laticínios por meio da abordagem multivariada. **Revista de Administração Mackenzie**, v.9, n.2, p.152-172, 2008.

FERREIRA, T. F., SANTOS, P. A., PAULA, A. V., DE CASTRO, H. F., ANDRADE, G. S. S. Biogas generation by hybrid treatment of dairy wastewater with lipolytic whole cell preparations and anaerobic sludge. **Biochemical Engineering Journal**, 169, 107965, 2021.

FERRER, I.; PONSÁ, S.; VÁZQUEZ, F.; FONT, X. Increasing biogas production by thermal (70°C) sludge pre-treatment prior to thermophilic anaerobic digestion. **Biochem. Eng. J.**, v.42, p.186-192, 2008.

FERRONATO, G. **Determinação de resíduos de agrotóxicos em azeite de oliva e azeitonas empregando método *QuEChERS* e UHPLC-MS/MS**. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós -Graduação em Química, RS, 2018.

FITZPATRICK, D. A.; O'GAORA, P.; BYRNE, K. P.; BUTLER, G. Analysis of gene evolution and metabolic pathways using the Candida Gene Order Browser. **BMC Genomics**, 11:290, 2010.

FLECK, A.; MUNRO, H. N. The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 55(5), 571 - 583, 1962.

FOGLER, H. S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. 3rd edition. Prentice Hall PTR, New Jersey, 1999.

FONTANA, A. et al. Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes. **Water Research**, v.134, p.181-191, 2018.

FOURNIER, G. P.; GOGARTEN, J. P. Evolution of Acetoclastic. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.3, p. 1124-1127, 2008.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil 1. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, 10, p. 1375-1380, 1986.

FRIGON, J. C.; BRETON, J.; BRUNEAU, T.; MOLETTA, R.; GUIOT, S. R. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. **Bioresour Technol.**, v.100, p.4156–63, 2009.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2–12, 2009.

GANNOUN, H.; KHELIFI, E.; BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HAMDI, M. Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter. **Bioresour Technol**, v.99, p.6105-11, 2008.

GARCIA, C.C.B. **Co-digestão anaeróbia de glicerol residual com esgoto sanitário em reator híbrido visando ao aumento da produção de biogás**. 2019. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

GAVALA, H. N.; KOPSINIS, H.; SKIADAS, I. V. et al. Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludge blanket reactor. **J Agric Eng Res.**, v.73, p.59–63, 1999a.

GAVALA, H. N.; SKIADAS, I. V.; LYBERATOS, G. On the performance of a centralized digestion facility receiving seasonal agroindustrial wastewaters. **Water Science and Technology**, v.40, n.1, p.339 – 346, 1999b.

GE, H.; JENSEN, P.D.; BATSTONE, D.J. Pre-treatment mechanisms during thermophilic–mesophilic temperature phased anaerobic digestion of primary sludge. **Water Res.**, v.44, p.123–130, 2010.

GERVAIS, P.; SARRETTE, M. Influence of age of mycelium and water activity of the medium on aroma production by *Trichoderma viride* grown on solid substrate. **J Ferment Bioeng.**, v.69, p.46–50, 1990.

GHALY, A. A comparative study of anaerobic digestion of acid cheese whey and dairy manure in a two-stage reactor. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 61-72, 1996.

GOBLOS, S. et al. Comparison of the effectivities of two-pHase and single-pHase anaerobic sequencing batch reactors during wastewater treatment. **Renewable Energy**, v.33, p. 960-965, 2008.

GONG, C.; MAUN, C. M.; TSAO, G. T. Direct fermentation of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous fungus, *Monilia* sp. **Biotechnol Lett.**, v.3, p.77–82, 1981.

GREENHILL, S. *Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel*. U.S. Patent Application 10/744,272, 22 dez. 2003.

GUEST, R. K.; SMITH, D.W. A potential new role for fungi in a wastewater MBR biological nitrogen reduction system. **J. Environ. Eng. Sci.**, 1, 433 – 437, 2002.

GUILLEN-JIMENEZ, E.; ALVAREZ-MATEOS, P.; ROMERO-GUZMAN, F.; PEREDA-MARIN, J. Bio-mineralization of organic matter in dairy wastewater, as affected by pH. The evolution of ammonium and phosphates. **Water Res.**, 34, p.1215–1224, 2000.

GUJER, W.; ZEHNDER, A. J. B. Conversion processes in anaerobic digestion. **Water Sci. Technol.** v.15, p.127-167, 1983.

GUTIRREZ, J. L. R. Anaerobic treatment of cheese-production wastewater using a UASB reactor. **Bioresour Technol.**, 37, p.271–276, 1991.

HANSEN, C. L.; CHEONG, D. Y. Agricultural Waste Management in Food Processing. In: **Handbook of Farm, Dairy, and Food Machinery Engineering**. Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013. ISBN 978-0-12-385881-8.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**, 19(4), p.479-488, 2006.

HE, X.; H.; XU, W.; LU, J.; WU, J.; GUO, Z.; WEI, X.; WANG, C. Enhanced direct interspecies electron transfer and methane production during anaerobic digestion of fat, oil, and grease by coupling carbon-based conductive materials and exogenous hydrogen. **Bioresource Technology**, Volume 364, 2022, 128083.

HOLLOWAY, B. W. Genetics of *Pseudomonas*. **Bacteriological Reviews**, v.33, n.3, p. 419-443, 1969.

HUANG, W.; WANG, Z.; ZHOU, Y.; NG, W. J. The role of hydrogenotrophic methanogens in an acidogenic reactor. **Chemosphere**, v.140, p.40-46, 2015.

HUBER, R. et al. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. **Arch. Microbiol.**, v. 144, p. 324-333, 1986.

HUTNAN, M.; KELESÁROVÁ, N.; BODÍK, I.; CZOLDEROVÁ, M. Long-term monodigestion of crude glycerol in a UASB reactor. **Bioresource Technology**, v.130, p.88- 96, 2013.

IAL (Instituto Adolfo Lutz). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 1020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Pecuária Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=74&z=t&o=24>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

IBRAHIM, M. A.R. Kinetics of anaerobic digestion of labaneh whey in a batch reactor. **African Journal of Biotechnology**, 13(16), p.1745-1755, 2014.

IKEDA, M.; SHIMADA, K.; SAKAGUCHI, T.; NAGATOMO, T. Gas chromatography of free fatty acids after treatment with iodine and iodine trichloride solution. **Bunseki Kagaku**, 31(2), p.E93-E98, 1982.

IMACHI, H.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y.; HANADA, S.; OHASHI, A.; HARADA, H. Pelotomaculum thermopropionicum gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic, syntrophic propionate-oxidizing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52, 1729 - 1735, 2002.

INCE, O. Potential energy production from anaerobic digestion of dairy wastewater. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, 33(6), p.1219 - 1228, 1998.

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELIŃSKI, M.; DĘBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4199-4205, 2008.

JEBARAJ; C. S. et al. Fungal diversity in oxygen-depleted regions of the Arabian Sea revealed by targeted environmental sequencing combined with cultivation. **FEMS Microbiol Ecol.**, v.71, p.399-412, 2010.

JO, Y.; KIM, J.; LEE, C. Continuous treatment of dairy effluent in a downflow anaerobic filter packed with slag grains: Reactor performance and kinetics. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.68, p.147-152, 2016.

JURGENSEN, L., EHIMEN, E. A., BORN, J., NIELSEN, J. B. H. A combination anaerobic digestion scheme for biogas production from dairy effluent - CSTR and ABR, and biogas upgrading. **Biomass and Bioenergy**, 111, p. 241 - 247, 2017.

KA, H.; SA, H.; AYA, T. The management of waste cooking oil: a preliminary survey. **Health Environ. J.**, 4, 1, p.76-81, 2013.

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

KASAPGIL, B.; ANDERSON, G. K.; INCE, O. An investigation into the pre-treatment of dairy wastewater prior to aerobic biological treatment. **Water Sci Technol.**, 29, p.205-212, 1994.

KEPP, U.; MACHENBACH, I.; WEISZ, N.; SOLHEIM, O.E. Enhanced stabilisation of sewage sludge through thermal hydrolysis—Three years of experience with full scale plant. **Water Sci. Technol.**, v.42, p.89–96, 2000.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3662-3672, 2011.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, v.199, p.42–48, 2016.

KISPERGHER, E. M.; AQUINO, C. A.; COSTA JUNIOR, L. C.; DE MELLO, T. C.; WEINSCHUTZ, R.; MATHIAS, A. L. Effect of organic load and alkalinity on dairy wastewater biomethanation. **Eng. Agric.**, v37, n4, p820-827, 2017.

KOLHE, A. S.; INGALE, S. R.; BHOLE, R. V. Effluent of dairy technology. **Int Res J II**, p.459–461, 2002.

KOVÁCS, E.; WIRTH, R.; MARÓTI, G.; BAGI, Z.; RÁKHELY, G.; KOVÁCS, K. L. **Biogas production from protein-rich biomass: Fed-batch anaerobic fermentation of casein and of pig blood and associated changes in microbial community composition.** PLoS ONE, 2013.

KRAMERS, H.; ALBERDA, G. Frequency response analysis of continuous flow systems. **Chemical Engineering Science**, v.2, p.173-181, 1953.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: A review. **Bioresour. Bioprocess**, 2017.

KUMAR, D.; MURTHY, G. S. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. **Biotechnol. Biofuels**, v.4, p.27, 2011.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; DO AMARAL, A. C. Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. Concórdia: Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019. 209 p.

KURAKOV, A. V.; KHIDIROV, K. S.; SADYKOVA, V. S.; ZVYAGINTSEV, D. G. Anaerobic Growth Ability and Alcohol Fermentation Activity of Microscopic Fungi. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.47, n.2, p. 169–175, 2011.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V. C.; MALL, I. D. An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, 51, p.442–452, 2011.

LANG, K. et al. New Mode of Energy Metabolism in the Seventh Order of Methanogens as Revealed by Comparative Genome Analysis of “Candidatus Methanoplasma termitum”. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n. 4, p.1338-1352, 2015.

LANGER, S. G. et al. Different response of bacteria, archaea and fungi to process parameters in nine full-scale anaerobic digesters. **Microbial biotechnology**, v.12, p.1210–1225, 2019.

LEAL, M. C. M. R. et al. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1173-1178, 2006.

LEBRATO, J.; PEREZ-RODRIGUEZ, J.L.; MAQUEDA, C.; MORILLO, E. Cheese factory wastewater treatment by anaerobic semicontinuous digestion. **Res. Cons. Recyc.**, 3, p.193 - 199, 1990.

LEE, C.; KIM, J.; SHIN, S.G.; O'FLAHERTY, V., HWANG, S. Quantitative and qualitative transitions of methanogen community structure during the batch anaerobic digestion of cheese-processing wastewater. **Appl Microbiol Biotechnol**, 87(5), p.1963-73, 2010.

LEITE BRASIL. **Ranking maiores Laticínios do Brasil**. Associação Brasileira dos Produtores de Leite, São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://leitebrasil.org.br/maiores%20laticinios.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

LETTINGA, G.; VAN VELSEN, A. F. M.; DE ZEEUW, W; HOBMA, S. W. The application of anaerobic digestion to industrial pollution treatment. **Proceedings of the 1st International Symposium on Anaerobic Digestion**, University College, Cardiff, Wales, p. 167-87, 1979.

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York, 1999.

LI, H.; LI, C.; LIU, W.; ZOU, S. Optimized alkaline pretreatment of sludge before anaerobic digestion. **Bioresour. Technol.**, v.123, p.189–194, 2012.

LI, X.; GUO, S.; PENG, Y.; HE, Y.; WANG, S.; LI, L.; ZHAO, M. Anaerobic digestion using ultrasound as pretreatment approach: Changes in waste activated sludge, anaerobic digestion performances and digestive microbial populations. **Biochem. Eng. J.**, v.139, p.139–145, 2018.

LI, Y.; PARK, S.Y.; ZHU, J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renew. Sustain. Energy Rev.** v.15, p.821-826, 2011.

LIM, J.; KIM, T.; HWANG, S. Treatment of fish-processing wastewater by co-culture of *Candida rugopelliculosa* and *Brachionus plicatilis*. Volume 37, Issue 9, May 2003, Pages 2228-2232.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D.S.P. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples, **Anal. Chim. Acta.** 465 (2002) 81 - 91.

LIMA, R. T. et al. Mycelium-bound lipase from *Penicillium citrinum* as biocatalyst for the hydrolysis of vegetable oils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.22, p.101410, 2019.

LIMA, R. T. **Produção de células íntegras de *Penicillium citrinum* para aplicação na hidrólise do óleo de soja**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas/MG, 2017a.

LIMA, L. P.; PEREZ, R.; CHAVES, J. B. P. **A indústria de laticínios no Brasil - um estudo exploratório**. Boletim centro de pesquisa e processamento de alimentos, v. 35, p. 1, 2017b.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1125, p.171-189, 2008.

LOPES, M. R. V.; AUED-PIMENTEL, S.; CARUSO, M. S. F.; JORGE, N.; RUVIERI, V. Composição de ácidos graxos em óleos e gorduras de fritura. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz**, 63(2), p.168-176, 2004.

LOVLEY, D. R.; KLUG, M. J. Methanogenesis from Methanol and Methylamines and Acetogenesis from Hydrogen and Carbon Dioxide in the Sediments of a Eutrophic Lake. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.45, p.1310–1315, 1983.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-276, 1951.

LUO, K.; YANG, Q.; LI, X.; YANG, G.; LIU, Y.; WANG, D.; ZHENG, W.; ZENG, G. Hydrolysis kinetics in anaerobic digestion of waste activated sludge enhanced by α -amylase. **Biochem. Eng. J.**, v.62, p.17-21, 2012.

MA, J.; FREAR, C.; WANG, Z.; YU, L.; ZHAO, Q.; LI, X.; CHEN, S. A simple methodology for rate-limiting step determination for anaerobic digestion of complex substrates and effect of microbial community ratio. **Bioresour. Technol.**, v.134, p.391-395, 2013.

McATEER, P. G., CHRISTINE TREGO, A., THORN, C., MAHONY, T., ABRAM, F., & O' FLAHERTY, V. Reactor configuration influences microbial community structure during high-rate, low-temperature anaerobic treatment of dairy wastewater. **Bioresource Technology**, p.123-221, 2020.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MANETTI, A. G. S. **Produção de Carboidratos a Partir do Efluente de Laticínios Tratados por Cianobactérias**. 2012. 248 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

MAO, C.; FENG, Y.; WANG, X.; REN, G. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. **Renew. Sustain. Energy Rev.**, v.45, p.540–555, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. 1952. 154p. Disponível: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtosanimal/emp>>

<resario/arquivosperguntaserespostasRIISPOASEI21000.039574201702.pdf>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

MASSE, L.; KENNED, K. J.; CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic pretreatment for fat particles in slaughterhouses wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p.145-155, 2001.

MEEGODA, J. N.; LI B.; PATEL K.; WANG L. B. A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion – A Review. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.15, p.2224, 2018.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 23, n. 4, p. 537-548, 2012.

MENDES, A. A. **Avaliação da Biodegradabilidade de Efluentes com Alto Teor de Lipídeos Previamente Tratados com Enzimas Hidrolíticas**. 2004. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, USP, Lorena/SP, 2004.

MENDES; A. A.; PEREIRA; E. B.; CASTRO, H. F. Biodegradation of wastewater from dairy industries previously treated with lipases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.2, p. 143-149, 2006.

MENG, Y.; LI, S.; YUAN, H.; ZOU, D.; LIU, Y.; ZHU, B.; LI, X. Effect of lipase addition on hydrolysis and biomethane production of Chinese food waste. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 452–459, 2015.

MERLIN CHRISTY, P.; GOPINATH, L.R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 34, p. 167–173, 2014.

MESQUITA, P.L., AFONSO, R.J.C.F, AQUINO, S.F., LEITE, G.S. Validation of a liquid chromatography methodology for the analysis of seven volatile fatty acids intermediates of anaerobic digestion. *Eng. Sanit. Ambient.*, 18 (04), p.295-302, 2013.

METCALF, L. D.; SCHMITZ, A. A. The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis. **Armour Industrial Chemical Co**, v.33, n.3,1961.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5ª edição. Tradução: Ivanildo Hespanhol, Jose Carlos Mierzwa. Bookman, 2016.

MILKPOINT. **Ranking Leite Brasil: captação das maiores empresas cresce 5,9% em 2014**. 2015. Disponível em:< <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/girolacteo/ranking-leite-brasil-captacao-das-maiores-empresas-cresce-59-em-2014-94625n.aspx>>. Acesso em: 01 mai. 2020.

MITCHELL, W. J. Carbohydrate assimilation by saccharolytic clostridia. **Res. Microbiol.**, v. 143, p. 245-250, 1992.

MOCKAITIS, G. et al. Anaerobic whey treatment by a stirred sequencing batch reactor (ASBR): effects of organic loading and supplemented alkalinity. **Journal of Environmental Management**, v.79, p.198–206, 2006.

MORTEZAEI, Y., AMANI, T., & ELYASI, S. High-rate anaerobic digestion of yogurt wastewater in a hybrid EGSB and fixed-bed reactor: Optimizing through response surface methodology. **Process Safety and Environmental Protection**, 113, p. 255 – 263, 2018.

MOURA, R. B. **Remoção de matéria orgânica e nitrogênio de esgoto sanitário em reator de leite estruturado submetido à aeração intermitente e circulação do efluente**. 2014. 200 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

NADAIS, H.; CAPELA, I.; ARROJA, L.; DUARTE, A. Treatment of dairy wastewater in UASB reactors inoculated with flocculent biomass. **Water SA**, v.31, p.603–607, 2005.

NADAIS, M. H. G. A. G.; CAPELA, M. I. A. P. F.; ARROJA, L. M. G. A.; HUNG, Y. T. Anaerobic treatment of milk processing wastewater. In: WANG, L. K.; TAY, J. H.; TAY, S. T. L.; HUNG, Y. T. **Handbook of environmental engineering**, USA: Humana Press, vol. 11, p. 555–618, 2010.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminant Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. E17-E38. 2007.

NAH, I. W.; KANG, Y. W.; HWANG, K. Y.; SONG, W. K. Mechanical pretreatment of waste activated sludge for anaerobic digestion process. **Water Res.**, v.34, p.2362–2368, 2000.

NAJAFPOUR, G. D.; HASHEMIYEH, B. A.; ASADI, M.; GHASEMI, M. B. Biological treatment of dairy wastewater in an upflow anaerobic sludge-fixed film bioreactor. **Am Euras J Agric Environ Sci**, v.4, p.251-7, 2008.

NAKASAKI, K.; NGUYEN, K. K.; BALLESTEROS, F. C.; MAEKAWA, T.; KOYAMA, M. Characterizing the microbial community involved in anaerobic digestion of lipid-rich wastewater to produce methane gas. **Anaerobe.**, 61, 102082, 2020.

NAKAYAMA, C. R. et al. Revealing archaeal diversity patterns and methane fluxes in Admiralty Bay, King George Island, and their association to Brazilian Antarctic Station activities. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v.58, n 1-2, p. 128-138, 2011.

NARIHIRO, T., SEKIGUCHI, Y. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. **Microbial Biotechnology**, v.4, n.5, p.585-602, 2011.

NECZAJ, E.; KACPRZAK, M.; KAMIZELA, T.; LACH, J.; OKONIEWSKA, E.

Sequencing batch reactor system for the co-treatment of landfill leachate and dairy wastewater. **Desalination**, 222, (1–3), p.404–409, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 7th ed. W. H. Freeman, 2017.

NESBO, C. L. et al. Evidence for existence of "mesotogas," members of the order Thermotogales adapted to low-temperature environments. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n. 7, p. 5061-8, Jul 2006. ISSN 0099-2240

NIERYCHLO, M., ANDERSEN, K.S., XU, Y., GREEN, N., JIANG, C., ALBERTSEN, M., DUEHOLM, M.S, NIELSEN, P.H. MiDAS 3: An ecosystem-specific reference database, taxonomy and knowledge platform for activated sludge and anaerobic digesters reveals species-level microbiome composition of activated sludge. **Water Res.**, 115955, 2020.

NIMKANDE, V. D.; BAFANA, A. A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, 46, p.102-591, 2022.

OREN, A. The Family Methanobacteriaceae. 2014. In: Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.

PAGLIANO, G., VENTORINO, V., PANICO, A., ROMANO, I., PIROZZI, F., PEPE, O. Anaerobic Process for Bioenergy Recovery from Dairy Waste: Meta-Analysis and Enumeration of Microbial Community Related to Intermediates Production. **Front Microbiol**. 8 (9), 3229, 2019.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolites production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PARK, J.; PARK, S.; KIM, M. Anaerobic degradation of amino acids generated from the hydrolysis of sewage sludge. **Environ. Technol.**, v.35, p.1133-1139, 2014.

PARKER, B. J.; WEARSCH, P. A.; VELOO, A. C.; RODRIGUEZ-PALACIOS, A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. **Front. Immunol.**, v.11, 2020.

PARZIANELLO, J. E. **Avaliação da biodigestão anaeróbia da mistura de resíduos avícolas e lácteos**. 2011. 36 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado e Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.

PAVLOSTATHIS, S. G., GIRALDO-GOMEZ, E. Kinetics of anaerobic treatment. **Water Science and Technology**, 24, (8), p.35-59, 1991.

PAVLOSTATHIS, S. G. Kinetics and Modeling of Anaerobic Treatment and Biotransformation Processes. **Comprehensive Biotechnology**, v.6, p.336–348, 2011.

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

PERNA, V. et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, n.1, p.54-62, 2013.

PESTA, G.; MEYER-PITTROFF, R.; RUSS, W. Utilization of whey. In: OREOPOULOU, W.; RUSS, W; editors. **Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry**. New York, NY, USA: Springer, pp. 193–205, 2007.

PEDERSEN-BJERGAARD, S., RASMUSSEN, K. E., GRØNHAUG HALVORSEN, T. Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 902(1), p.91-105, 2000.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: a review. **J Envir Man.**, v.110, p.48–68, 2012.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, 3, p.51-64, 2011.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998.

QUÉMÉNUER, M.; MARTY, Y. Fatty acids and sterols in domestic wastewater. **Water Research**, v.28, p.1217-1226, 1994.

RAINEY, F. A. Pelotomaculum. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 1–6, 2015.

REYSENBACH, A. L. Thermotogales ord. nov. In: (Ed.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. ISBN 9781118960608.

RICHARDS, M. A.; LIE, T. J.; ZHANG, J.; RAGSDALE, S. W.; LEIGH, J. A.; PRICE, N. D. Exploring hydrogenotrophic methanogenesis: A genome scale metabolic reconstruction of *Methanococcus maripaludis*. **J. Bacteriol.**, v.198, p.3379–3390, 2016.

RIPLEY, A. L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Alkalimetric improved for anaerobic digestion wastes monitoring of high-strength wastes. **V.58**, n.5, p.406-411, 1986.

RIVAS, J.; PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; BELTRÁN, F. Treatment of cheese whey wastewater: combined coagulation–flocculation and aerobic biodegradation. **J Agric Food Chem.**, v.58, n.13, p.7871–7, 2010.

RODGERS, M.; ZHAN; XIN-MIN; DOLAN, B. Mixing characteristics and whey wastewater treatment of a novel moving anaerobic biofilm reactor. **J Environ Sci Health, Part A Toxic/Hazard Subst Environ Eng.**, v.A39, n.8, p.2183–93, 2004.

ROMERO, C.M.; BAIGORI, M.D.; PERA, L.M. Catalytic properties of mycelium

bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 861–866, 2007.

ROSENWINKEL, K. H.; AUSTERMANN-HAUN, U.; MEYER, H. Industrial wastewater sources and treatment strategies. In: JÖRDENING H. J.; WINTER J., editors. **Environmental biotechnology: concepts and applications**. Weinheim, Germany: Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 69–70, 2005.

ROSSET, I. G. **Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SADDLER, J. N.; CHAN, M. K. H. Optimization of *Clostridium thermocellum* growth on cellulose and pretreated wood substrates. **Eur J Appl Microbiol Biotechnol.**, v.16, p.99–104, 1982.

SADDOUD, A.; HASSAÏRI, I.; SAYADI, S. Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. **Bioresour Technol**, v.98, p.2102-8, 2007.

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

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, n.2, p.185-194, 2009.

SANKARAN, S.; KHANAL, S. K.; JASTI, N.; JIN, B.; POMETTO III, A. L.; VAN LEEUWEN, J. H. Use of Filamentous Fungi for Wastewater Treatment and Production of High Value Fungal Byproducts: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 40:5, 400-449, 2010.

SANTOS, A. C. **Tratamento de águas residuárias de laticínio em reatores anaeróbios alternativos**. 2015. 125 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

SARAIVA, C. B.; PEREIRA, D. A. **Diagnóstico Ambiental de um Laticínio de Pequeno Porte**. II Congresso Latino Americano de Agroecologia, Curitiba-PR, Brasil, 2009.

SARKAR, O.; KUMAR, A. N.; DAHIYA, S.; KRISHNA, K. V.; YERUVA, D. K.; MOHAN, S. V. Regulation of acidogenic metabolism towards enhanced short chain fatty acid biosynthesis from waste: metagenomic profiling. **RSC Adv.**, 6, 18641-18653, 2016.

SCHMIDELL, W. LIMA, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotechnologia industrial volume 1: fundamentos**. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo-SP, 2001.

SCHNEIDER; W. C. Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. **J .Biol. Chem.**

161: 293-303, 1945.

SCHROECKH, V. et al. Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. **PNAS**, v.106, n.34, p.14558-14563, 2009.

SCOMA, A.; BERTIN, L.; ZANAROLI, G.; FRARACCIO, S.; FAVA, F. A physicochemical-biotechnological approach for an integrated valorization of olive mill wastewater. **Bioresour. Technol.**, 102 (22), p.10273-10279, 2011.

SEBAIHIA, M. et al. Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. **Genome Research**, v.17, p.1082-1092, 2007.

SENGIL, A.; OZACAR, M. Treatment of dairy wastewaters by electrocoagulation using mild steel electrodes. **J Hazard Mater**, 137, p.1197–1205, 2006.

SERRANO, A.; SILES, J.A.; CHICA, A.F.; MARTIN, M.A. Improvement of mesophilic anaerobic co-digestion of agri-food waste by addition of glycerol. **Journal of Environmental Management**, v.140, p.76-82. 2014.

SEVIOUR, R.; NIELSEN, P. H. **Microbial Ecology of Activated Sludge**. London, UK: IWA Publishing, 2010.

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93-100, 2013.

SILVA, M. L. R. **Análise dos parâmetros que interferem no metabolismo da microbiota anaeróbia e anóxica de bifenilas policloradas**. 2015. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

SKIADAS, I.V.; GAVALA, H.N.; LU, J.; AHRING, B.K. Thermal pre-treatment of primary and secondary sludge at 70 °C prior to anaerobic digestion. **Water Sci. Technol.**, v.52, p.161–166, 2005.

SLAVOV, A. K. General Characteristics and Treatment Possibilities of Dairy Wastewater – A Review. **Food Technology. Biotechnology**, v. 55, p.14–28, 2017.

SMITH, J. M. **Chemical Engineering Kinetics**. 3rd edition. McGraw-Hill, New York, 1981.

SOARES, M. S. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, v.2., 474 p., 2002.

SONG, H. et al. Construction of a whole-cell catalyst displaying a fungal lipase for effective treatment of oily wastewaters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.71, p.166–170, 2011.

SPEECE, R. E. **Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater**. Archae Press: Nashville, TN, USA, 1996.

STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. **Nat. Rev. Microbiol**, v.7, p.568-577, 2009.

STEVENSON, G.B. **Biologia dos fungos, bactérias e vírus**. São Paulo: Polígono Ed. USP, 1994.

SU, X. L.; TIAN, Q.; ZHANG, J.; YUAN, X. Z.; SHI, X. S.; GUO, R. B.; QIU, Y. L. *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., sp. nov., an anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2014.

SUN, L.; TOYONAGA, M.; OHASHI, A. *Lentimicrobium saccharophilum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium representing a new family in the phylum Bacteroidetes, and proposal of Lentimicrobiaceae fam. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, April 2016, 66(7).

TAKEDA, P. Y. **Manutenção da produção de metano em indústrias sucroalcooleiras, a partir da substituição de vinhaça por glicerol no período de entressafra de cana de açúcar**. 2021. 121f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

TAN, T.; CHENG, P. Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. **Appl Biochem Biotechnol.**, 104, 119–128, 2003.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. M.; TERRA, N. N. Particularidades na fabricação de salame. São Paulo: Editora Livraria Varela, 2004. 152 p.

THERMO FISHER SCIENTIFIC (2009). **NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer**, V1.0 user manual.

TONIAL, I. B.; MATSUSHITA, M.; DE SOUZA, N. E.; PERINI, J. A. DE L.; DE MORAIS, D. R.; BANI, F. A.; VISENTAINER, J. V. Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poli-insaturados em leite de vaca. **Alan**, v.59, n.1, 2009.

TORRES, A.P. OLIVEIRA, F.A.R. (1998), Residence Time Distribution Studies in Continuous Thermal Processing of Liquids Foods: A Review.

TOYO’OKA, T. Fluorescent tagging of physiologically important carboxylic acids, including fatty acids, for their detection in liquid chromatography, **Anal. Chim. Acta**. 465 (2002) 111 - 130.

TOYO’OKA, T. **Modern Derivatization Methods for Separation Sciences**, John

Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1999.

TRABULSI, L R; ALTERTHUM, F. Microbiologia. São Paulo; Atheneu; 5 ed; 2008. 760 p.

TREU, L., TSAPEKOS, P., PEPRAH, M., CAMPANARO, S., GIACOMINI, A., CORICH, V., KOUGIAS, P.G., ANGELIDAKI, I. Microbial profiling during anaerobic digestion of cheese whey in reactors operated at different conditions. **Bioresour. Technol.**, 275, p.375-385, 2019.

VAN LEEUWEN, J.; HU, Z.; YI, T. W.; POMETTO III, A. L.; JIN, B. Kinetic model for selective cultivation of microfungi in a microscreen process for food processing wastewater treatment and biomass production. **Acta Biotechnol.**, 23, 289 – 300, 2003.

VAN LIER, J. B.; MAHMOUD, N.; ZEEMAN, G. Anaerobic Wastewater Treatment. In Biological Wastewater Treatment: **Principles, Modelling and Design; International Water Association**. London: UK, p. 401–442, 2008.

VANWONTERGHEM, I. et al. Methylotrophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum *Verstraetearchaeota*. **Nature Microbiology**, v.1, p. 16170, 2016.

VENETSANEAS, N.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresour Technol.**, v. 100, p. 3713-7, 2009.

VERMA, S. **Anaerobic Digestion of Biodegradable Organics in Municipal Solid Wastes**. Columbia University: New York, NY, USA, 2002.

VIDAL, G.; CARVALHO, A.; MENDEZ, R.; LEMA J. M. Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. **Bioresour Technol.**, 74 (3), p.231-239, 2000.

VINDEROLA, G.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. **Crc Press.**, 2019.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica: Estrutura e Função**. Porto Alegre: Bookman. 4.ed., 2004.

VON SPERLING, M. (1998). Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias**, v. 1, 2º ed, Belo Horizonte: DESA/UFMG, 169-170.

USACK, J. G.; SPIRITO, C. M.; ANGENENT, L. T. Continuously-stirred anaerobic digester to convert organic wastes into biogas: system setup and basic operation. **J Vis Exp.**, v.65, p.3978, 2012.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WANG, M-X.; ZHANG, Q-L.; YAO, S-J. A novel biosorbent formed of marine-derived *Penicillium janthinellum* mycelial pellets for removing dyes from dye-containing wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v.259, 1, p.837-844, 2015.

WANG, S.; CHANDRASEKHARA, R. N.; QIU, R.; MOLETTA, R. Performance and kinetic evaluation of anaerobic moving bed biofilm reactor for treating milk permeate from dairy industry. **Bioresour Technol.**, 100, p.5641–5647, 2009.

WATKINS, M.; NASH, D. Dairy factory wastewaters, their use on land and possible environmental impacts – a mini review. **Open Agric J.**, 4, (1), 2010.

WENG, C. N.; JERIS, J. S. Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids. **Water Research**, v. 10, p. 9-18, 1976.

WHILEY, R.A., HARDIE J. M. Genus I. Streptococcus Rosenbach 1884, 22AL ROBERT. In: DE VOS P. et al. (eds) **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes**, Springer, New York, NY, p. 655 – 711, 2009.

WU, X.; YAO, W.; ZHU, J. Effect of pH on continuous biohydrogen production from liquid swine manure with glucose supplement using an anaerobic sequencing batch reactor. **Int. J. Hydrog. Energy**, v.35, p.6592-6599, 2010.

XIA, Y. Q., WHIGAN, D. B., JEMAL, M. A simple liquid-liquid extraction with hexane for low-picogram determination of drugs and their metabolites in plasma by high performance liquid chromatography with positive ion electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 13(15), p.1611-1621, 1999.

XU, P.; ALVES, J. M.; KITTEN, T.; BROWN, A.; CHEN, Z.; OZAKI, L. S.; MANQUE, P.; GE, X.; SERRANO, M. G.; PUIU, D.; HENDRICKS, S.; WANG, Y.; CHAPLIN, M. D.; AKAN, D.; PAIK, S.; PETERSON, D. L.; MACRINA, F. L.; BUCK, G. A. Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. **J. Bacteriol. Res.**, 189 (8), p.3166-3175, 2007.

YANG, K.; YU, Y.; HWANG, S. Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. **Water Res.**, v.37, p.2467–77, 2003.

YAN, J. Q.; LO, K. V.; LIAO, P. H. Anaerobic digestion of cheese whey using up-flow anaerobic sludge blanket reactor. **Biological Wastes**, 27(4), p.289-305, 1989.

ZAIAT, M., CABRAL, A.K.A., FORESTI E. Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge reactor for wastewater treatment: conception and performance evaluation. **Brazilian J Chem Eng.**, v.11, p.33 – 42, 1994.

ZEHNDER, A. J. B.; GUJER, W. Conversion processes in anaerobic digestion. **Water Sci Technol.**, 15, p.127–167, 1983.

ZHANG, Y.; RITTMANN, B. E.; WANG, J.; SHENG, Y.; YU, J.; SHI, H.; QIAN, Y.

High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. v.40, 2, p.857-863, 2005.

ZHENG, S., YANG, M., YANG, Z. Biomass production of yeast isolated from salad oil manufacturing wastewater. **Bioresour. Technol.**, 96, 1183–1187, 2005.

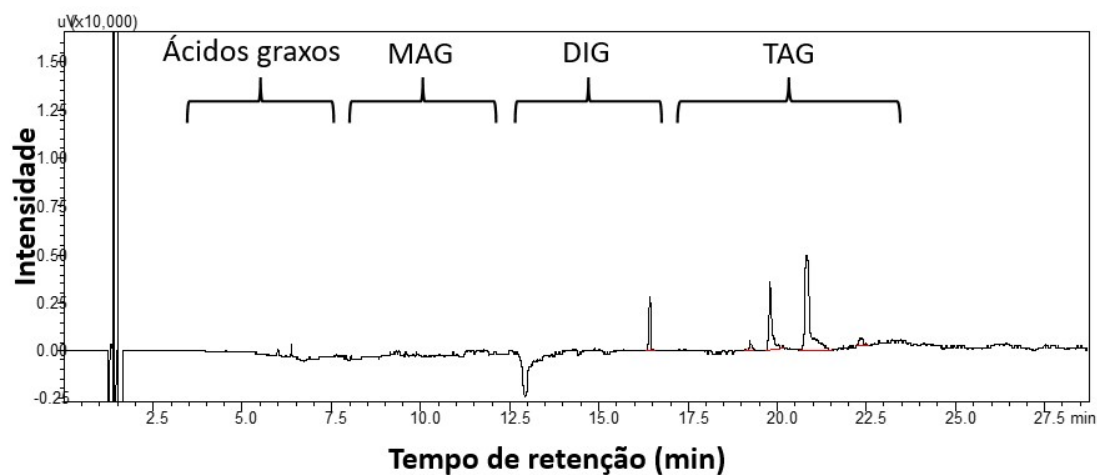
ZOCCAL, R. **Ações e tendências nas indústrias de laticínios**. Balde Branco, São Paulo, v. 52, n. 632, p. 8-9, 2017.

ZUPANCIC, R. M. Heat and energy requirements in thermophilic anaerobic sludge digestion. **Renew Energy**, 28, p.2255–2267, 2003.

APÊNDICE A:

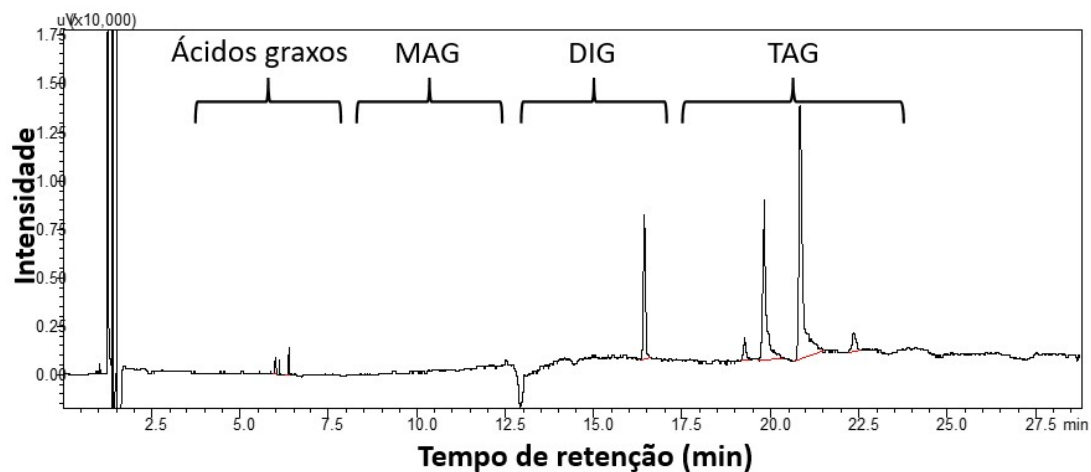
Cromatogramas do óleo de soja de 10 a 100 mg por mL de Acetato de Etila grau HPLC.

Figura A1 - Cromatograma do Óleo de Soja 10 mg/mL de Acetato de Etila.

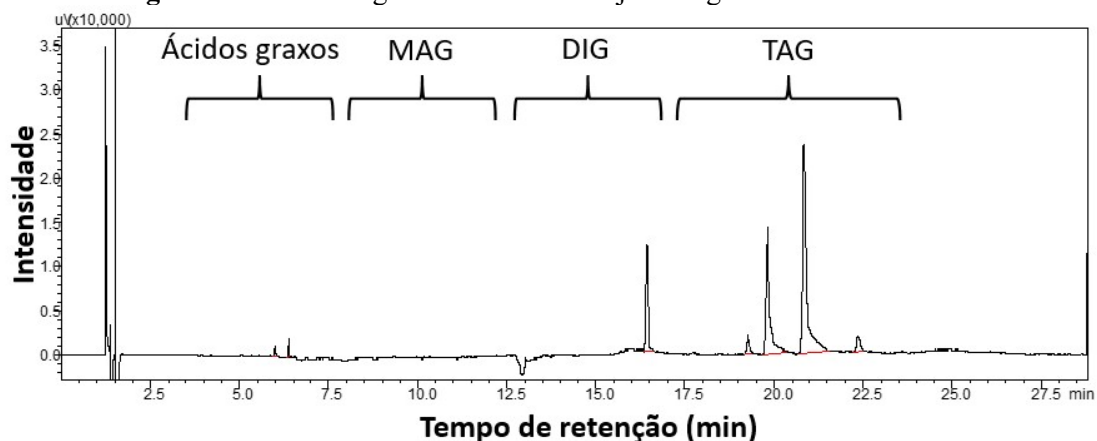


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	16.422	10437.5	2862.6	11.87721				
2	19.236	2812.0	490.4	3.19982				
3	19.806	22562.2	3574.4	25.67428				
4	20.842	49027.1	4903.0	55.78953				
5	22.337	3039.9	392.5	3.45916				

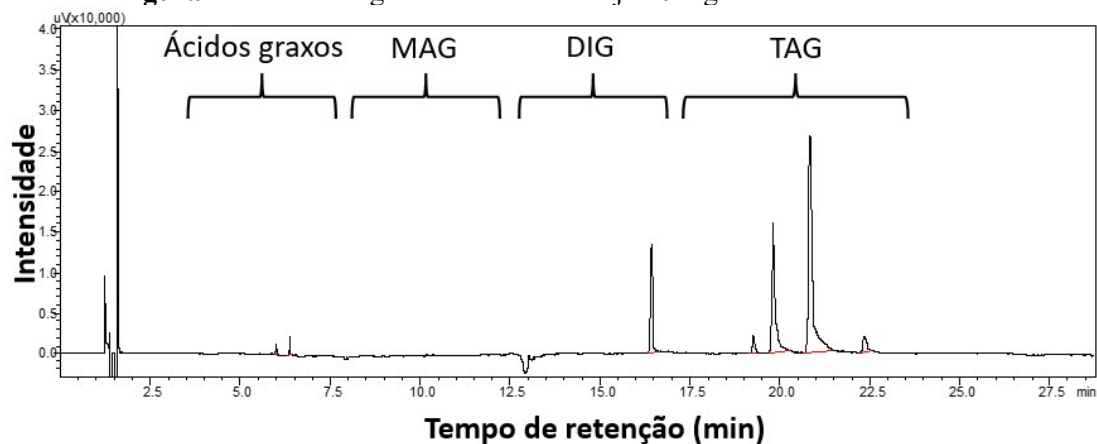
Figura A2 - Cromatograma do Óleo de Soja 20 mg/mL de Acetato de Etila.



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.001	1605.7	808.9	0.79166				
2	6.368	2832.9	1405.4	1.39669				
3	16.429	25246.3	7348.2	12.44708				
4	19.270	6050.4	1138.4	2.98299				
5	19.817	56065.1	8115.5	27.64155				
6	20.842	103835.9	13015.3	51.19376				
7	22.362	7192.9	925.4	3.54627				

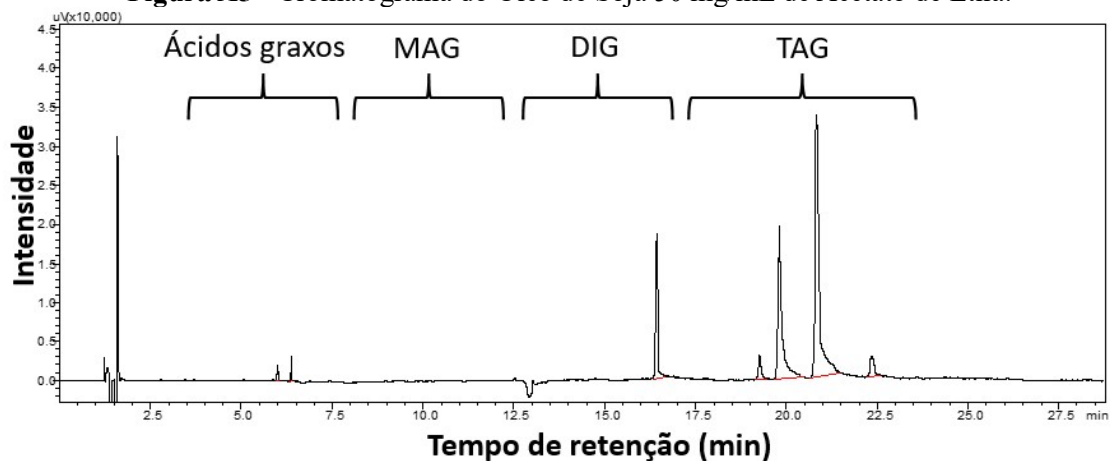
Figura A3 - Cromatograma do Óleo de Soja 30 mg/mL de Acetato de Etila.

Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.003	2557.8	1272.8	0.70012				
2	6.369	4420.6	2201.9	1.21003				
3	16.434	44687.4	11896.6	12.23192				
4	19.269	10819.5	2115.8	2.96153				
5	19.815	102104.3	14333.2	27.94821				
6	20.840	188526.9	23481.7	51.60400				
7	22.361	12217.5	1658.6	3.34419				

Figura A4 - Cromatograma do Óleo de Soja 40 mg/mL de Acetato de Etila.

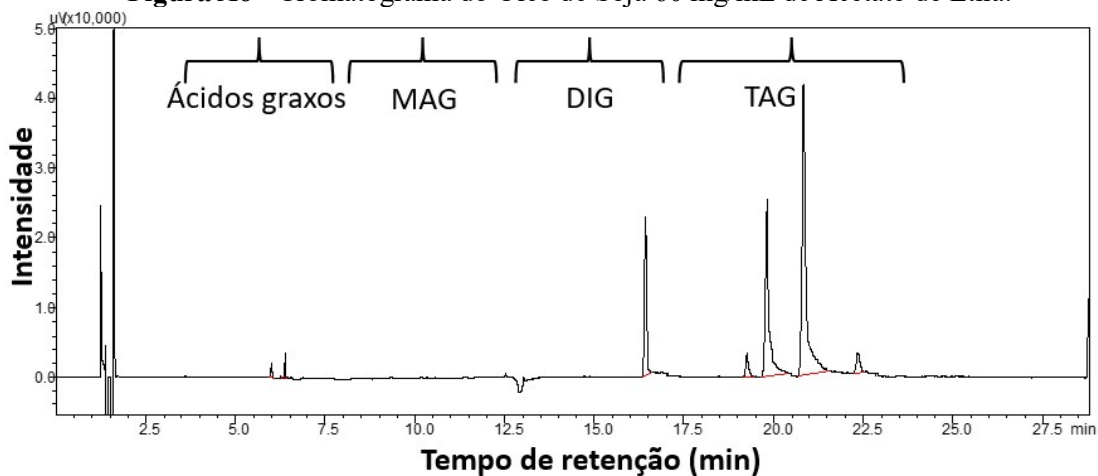
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.004	2947.0	1454.3	0.73214				
2	6.370	4988.1	2495.6	1.23921				
3	16.429	50339.0	13338.9	12.50578				
4	19.266	12306.2	2419.4	3.05724				
5	19.816	108982.0	16079.5	27.07454				
6	20.839	209239.8	26661.1	51.98172				
7	22.353	13723.6	1870.4	3.40938				

Figura A5 - Cromatograma do Óleo de Soja 50 mg/mL de Acetato de Etila.



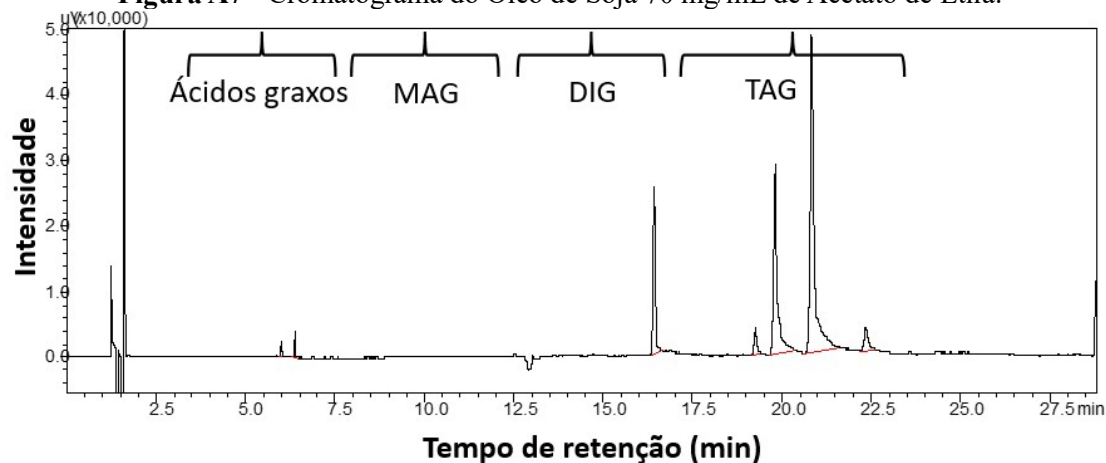
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.002	3767.4	1812.0	0.70231				
2	6.369	6059.6	3084.0	1.12962				
3	16.430	67638.0	18453.8	12.60899				
4	19.265	16892.8	2942.8	3.14913				
5	19.804	153392.9	19515.8	28.59530				
6	20.831	269257.1	33565.8	50.19455				
7	22.359	19419.2	2436.9	3.62011				

Figura A6 - Cromatograma do Óleo de Soja 60 mg/mL de Acetato de Etila.



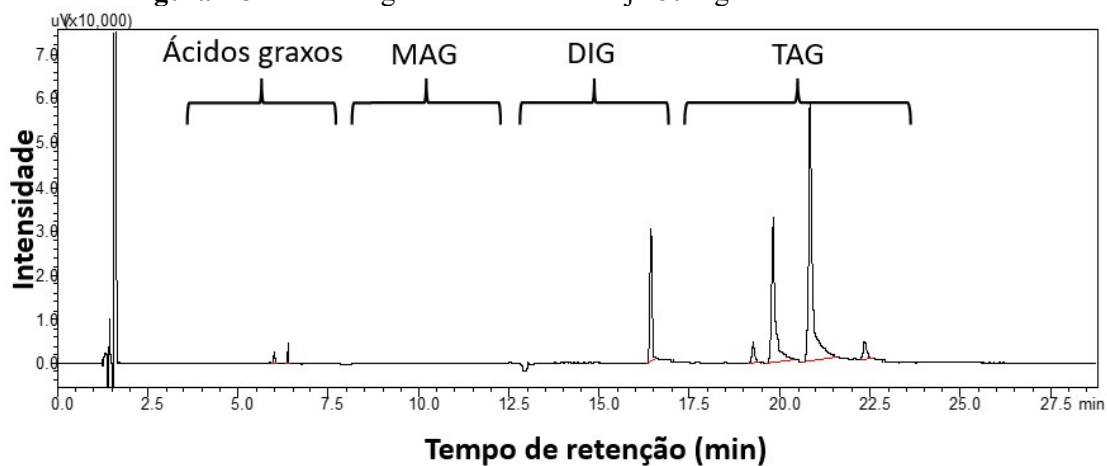
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.004	4332.1	2179.1	0.66910				
2	6.369	7444.8	3741.7	1.14987				
3	16.427	80433.2	22516.6	12.42307				
4	19.263	20096.1	3512.4	3.10389				
5	19.809	181640.8	25228.4	28.05480				
6	20.838	332784.4	41499.3	51.39924				
7	22.351	20718.7	2818.3	3.20004				

Figura A7 - Cromatograma do Óleo de Soja 70 mg/mL de Acetato de Etila.



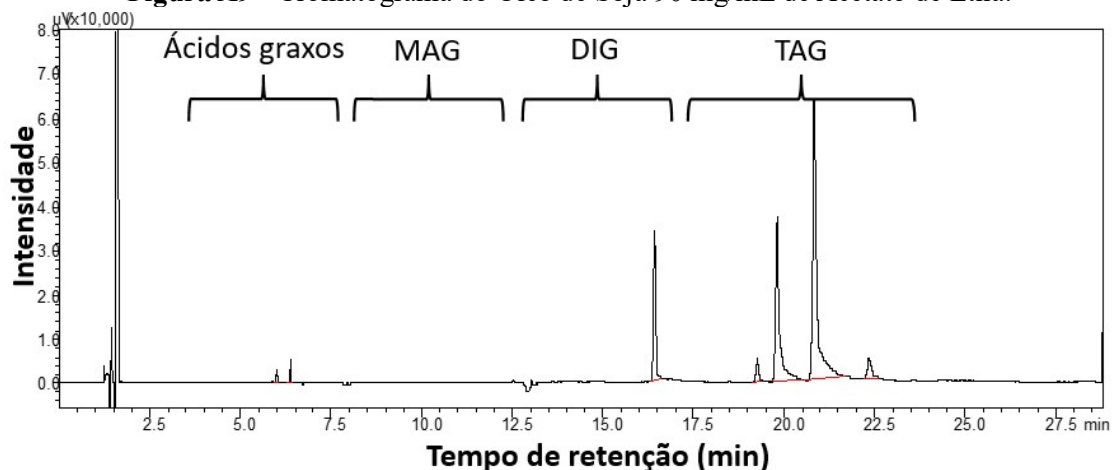
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.002	4738.8	2379.0	0.62731				
2	6.368	9515.6	4292.8	1.25965				
3	16.427	95489.7	25315.9	12.64074				
4	19.263	22114.3	3934.5	2.92745				
5	19.810	207531.5	28798.8	27.47262				
6	20.833	387284.5	48018.1	51.26797				
7	22.356	28737.9	3605.4	3.80426				

Figura A8 - Cromatograma do Óleo de Soja 80 mg/mL de Acetato de Etila.



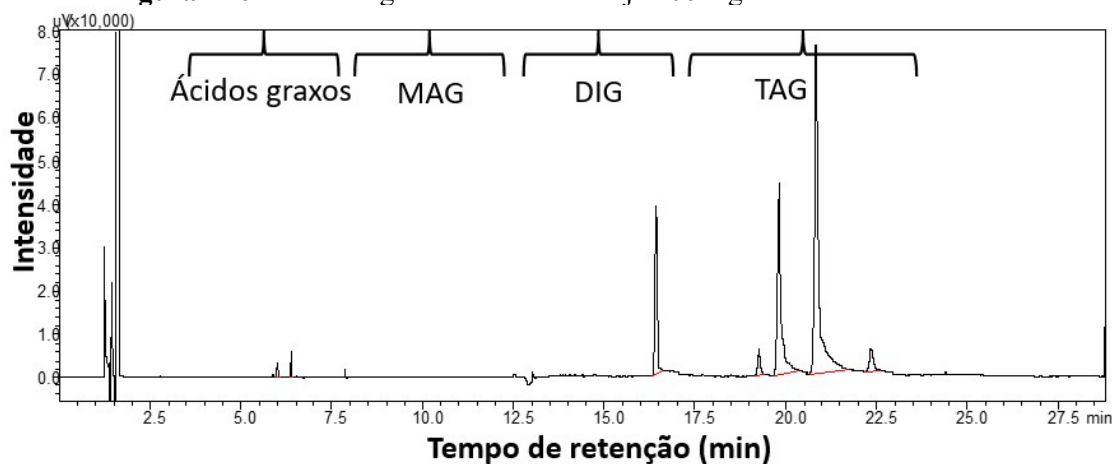
Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.004	5650.8	2770.5	0.65642				
2	6.369	10579.5	4815.9	1.22895				
3	16.430	105324.6	29917.4	12.23486				
4	19.264	26226.6	4757.5	3.04657				
5	19.811	241230.9	32602.2	28.02221				
6	20.839	442008.9	57683.8	51.34527				
7	22.354	29834.7	3999.5	3.46571				

Figura A9 - Cromatograma do Óleo de Soja 90 mg/mL de Acetato de Etila.



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.004	6413.8	3145.9	0.62878				
2	6.370	12022.1	5531.5	1.17860				
3	16.427	125548.6	33531.6	12.30827				
4	19.264	29711.2	5577.2	2.91277				
5	19.809	284495.8	37269.9	27.89079				
6	20.833	523887.9	63332.7	51.35982				
7	22.344	37955.2	4611.2	3.72097				

Figura A10 - Cromatograma do Óleo de Soja 100 mg/mL de Acetato de Etila.

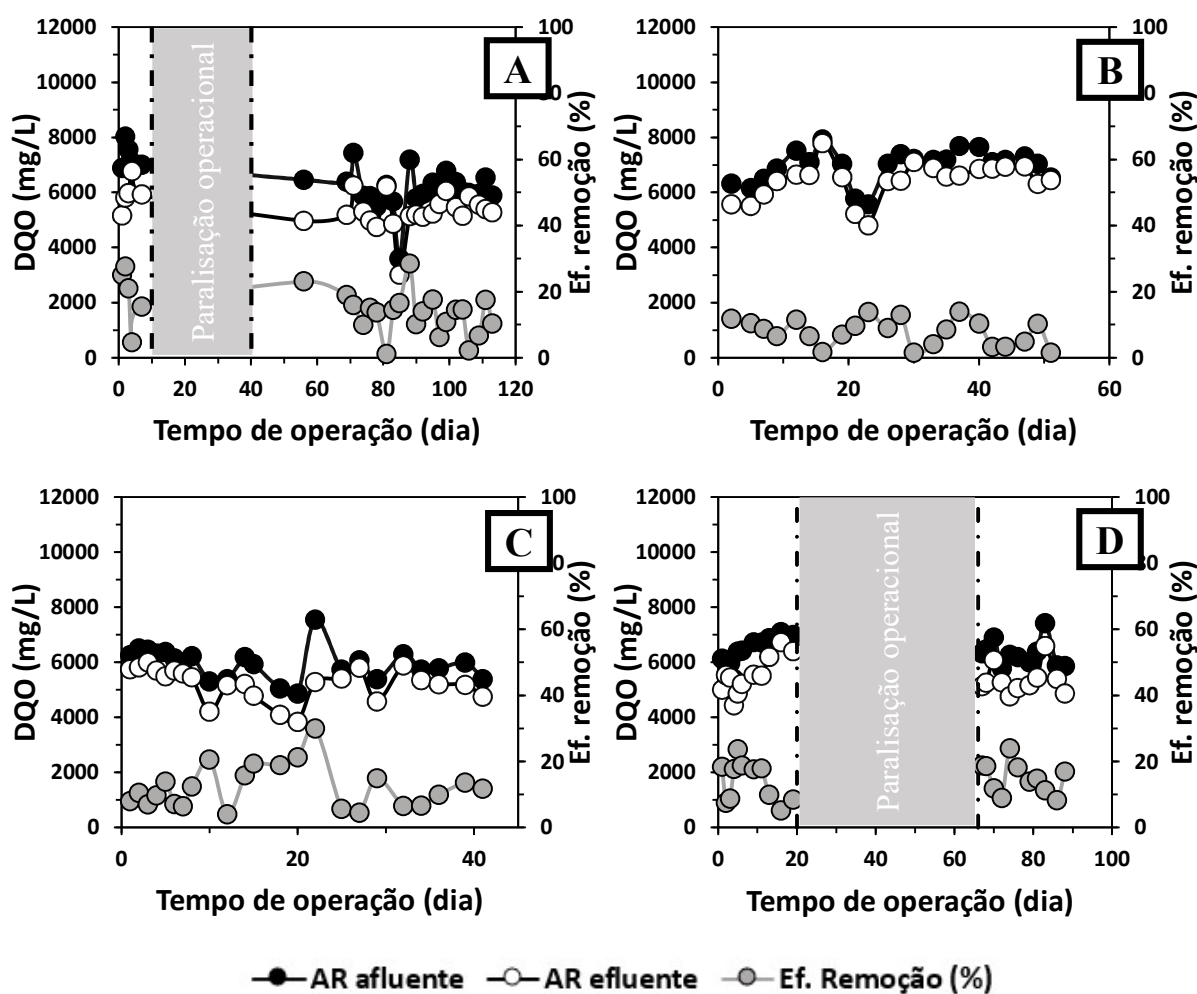


Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#	Compound Name
1	6.004	7321.3	3616.6	0.62427				
2	6.370	12819.8	6173.4	1.09311				
3	16.429	142272.5	38438.8	12.13118				
4	19.263	34777.8	6220.0	2.96540				
5	19.813	321543.3	44210.8	27.41709				
6	20.832	610888.3	75469.0	52.08873				
7	22.350	43161.0	5323.0	3.68022				

APÊNDICE B:

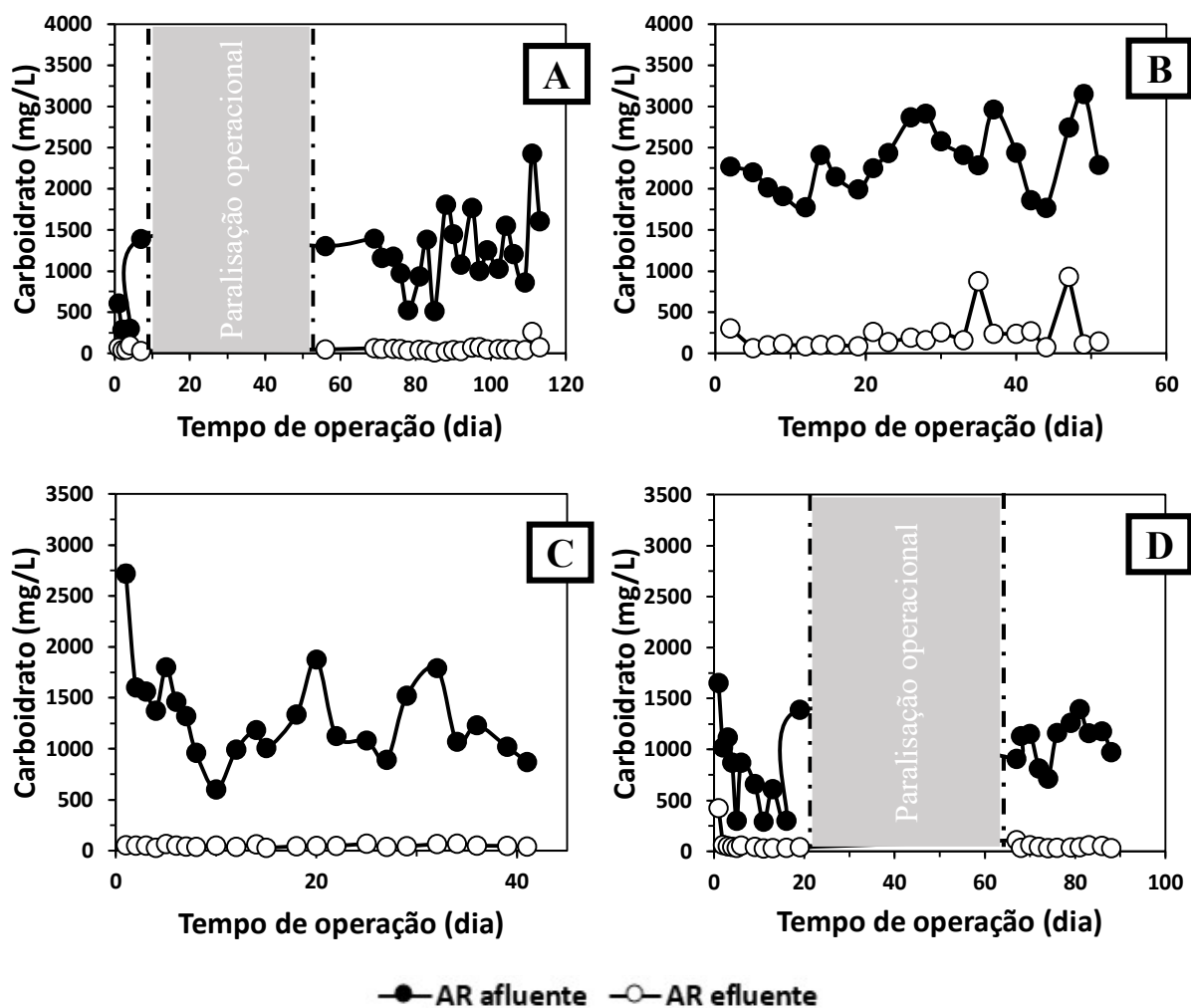
Perfis de remoção da matéria orgânica, monitoramento do pH e bioconversão dos carboidratos, gliceróis e proteínas da água residuária de laticínios, durante a operação dos reatores contínuos de fase ácida (pré-tratamento biológico).

Figura B1 - Perfis de remoção de DQO do reator (a) RHA1; (b) RHA2; (c) RH3 e (d) RH4.



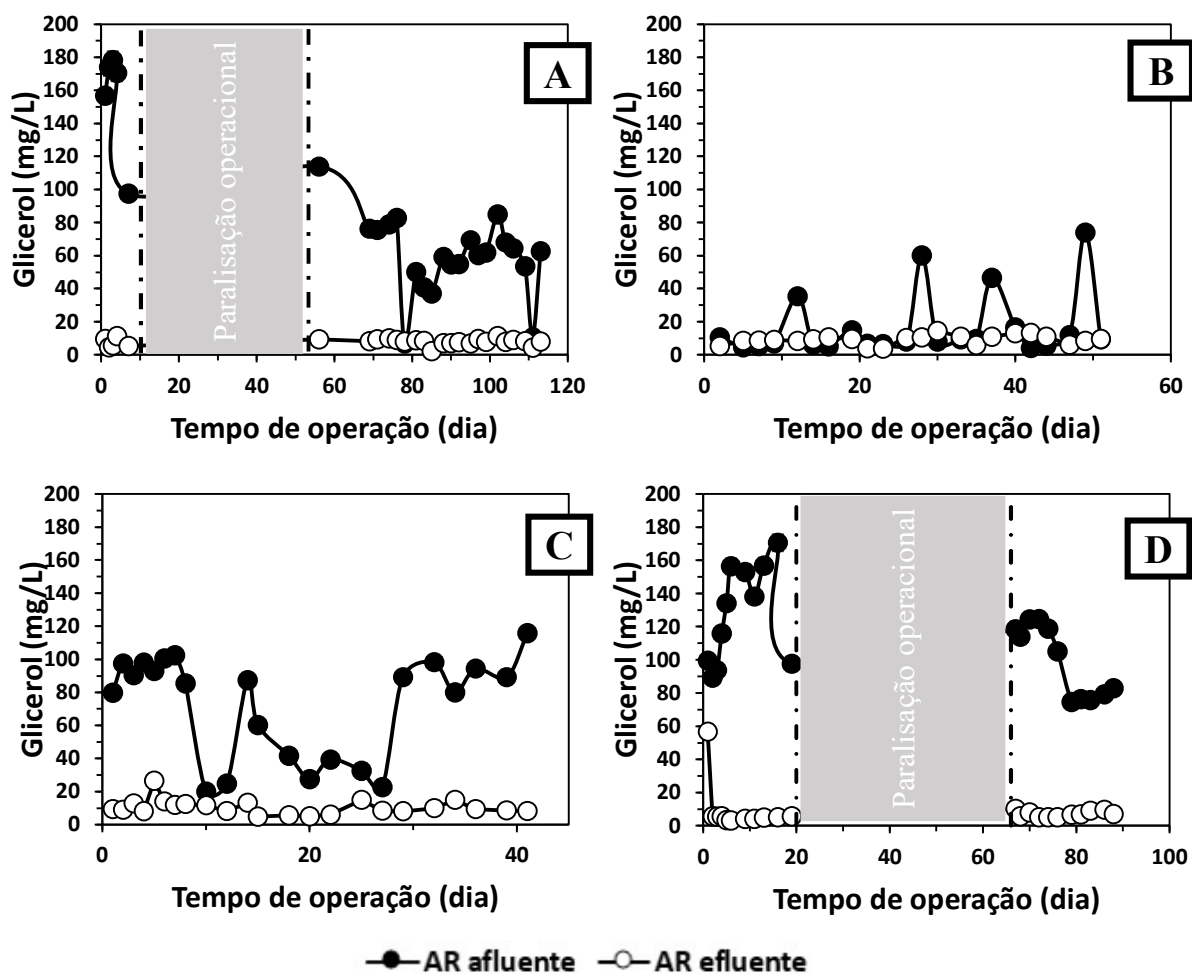
RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

Figura B2 - Perfis de conversão de carboidratos durante a operação do reator (a) RHA1; (b) RHA2; (c) RH3 e (d) RH4.



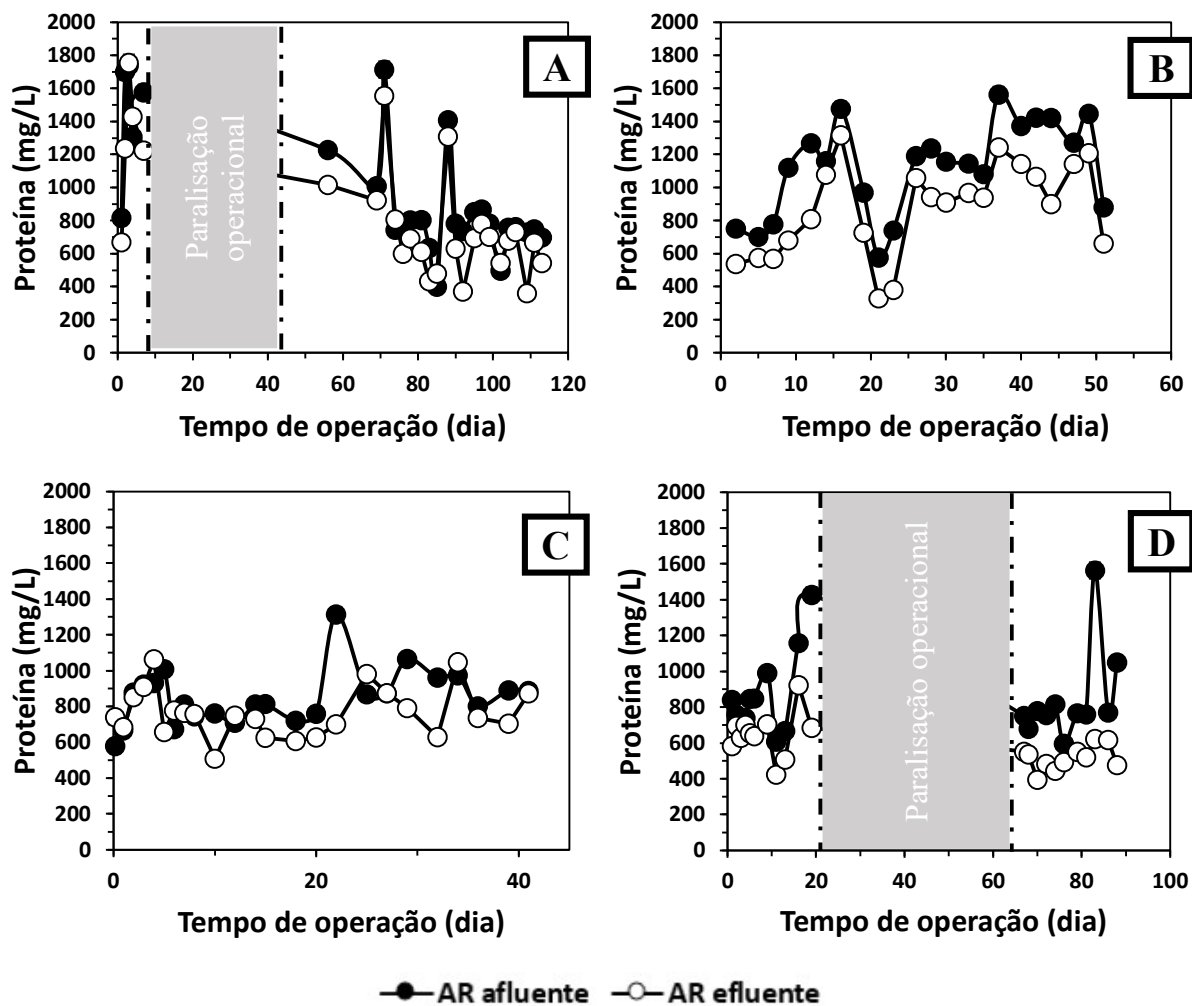
RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

Figura B3 - Perfis de conversão dos gliceróis durante a operação do reator (a) RHA1; (b) RHA2; (c) RH3 e (d) RH4.



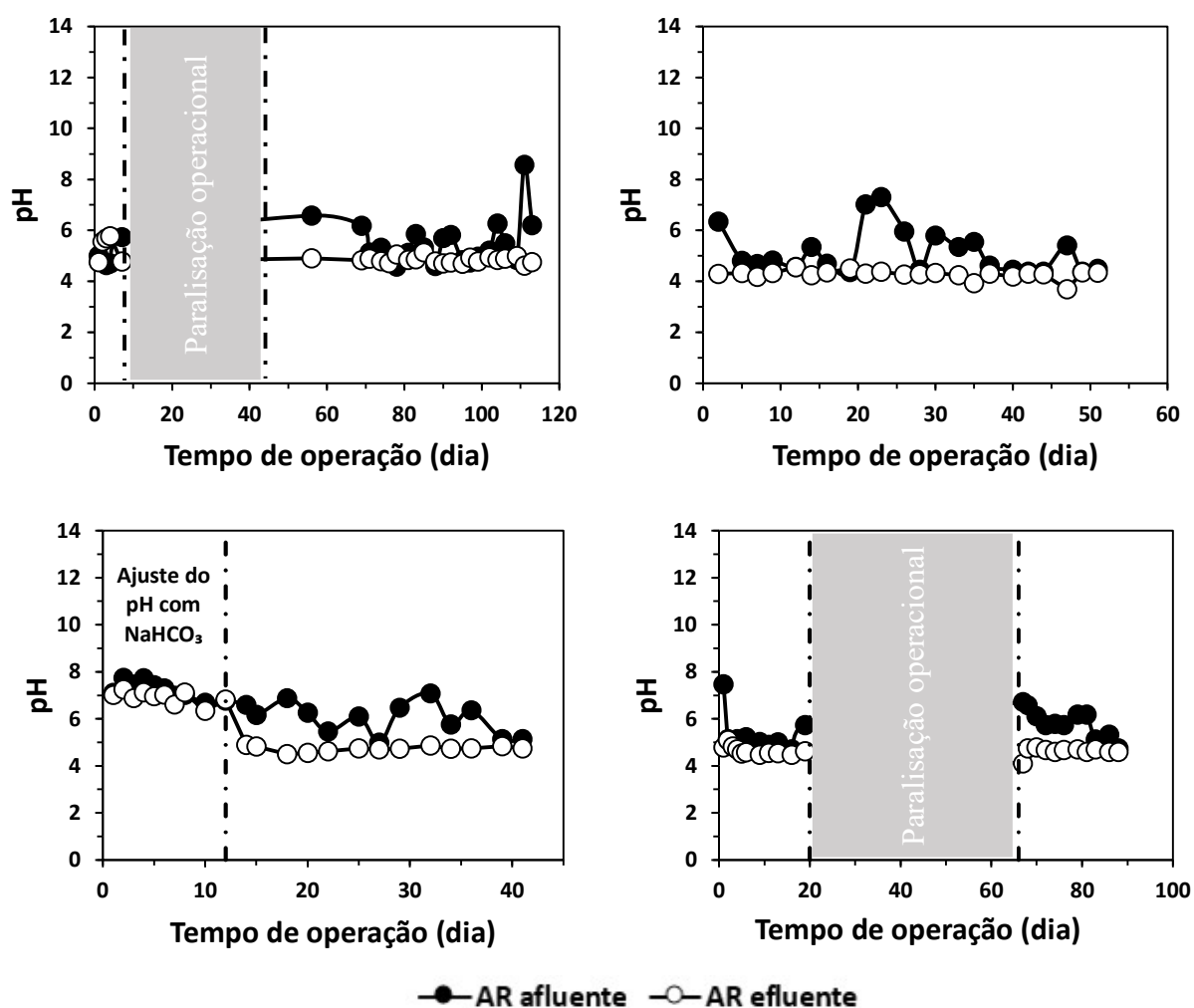
RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

Figura B4 - Perfis de conversão das proteínas durante a operação do reator (a) RHA1; (b) RHA2; (c) RH3 e (d) RH4.



RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

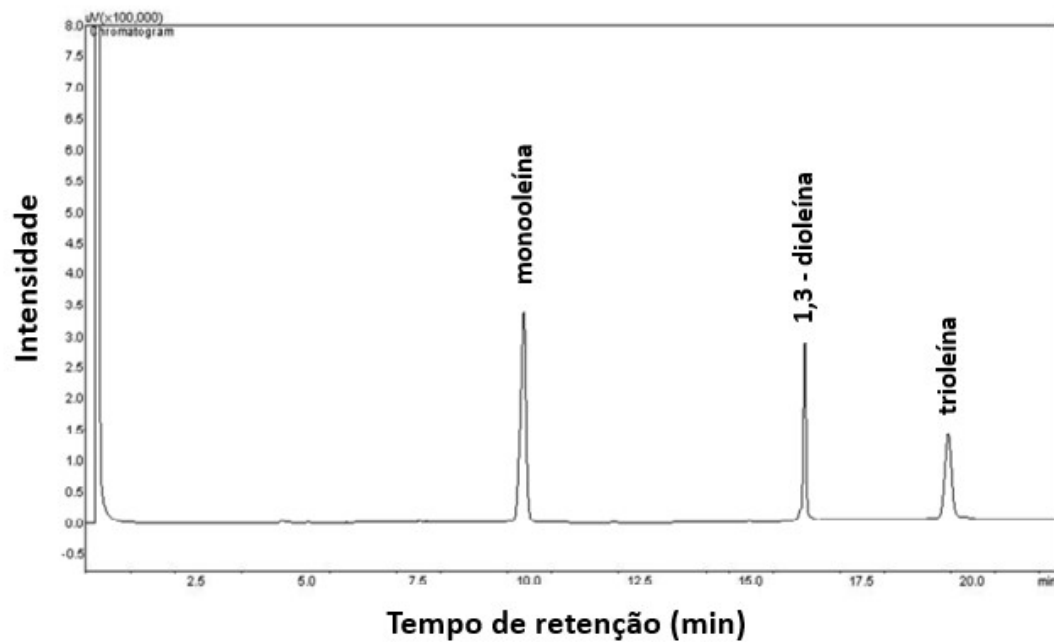
Figura B5 - Perfis de pH durante a operação do reator (a) RHA1; (b) RHA2; (c) RH3 e (d) RH4.



RHA1 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e autoinoculado (controle); RHA2 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e autoinoculado (controle); RH3 = reator hidrolítico/fermentativo com topo aberto e inoculado com 7500U; RH4 = reator hidrolítico/fermentativo com topo fechado e inoculado com 7500U.

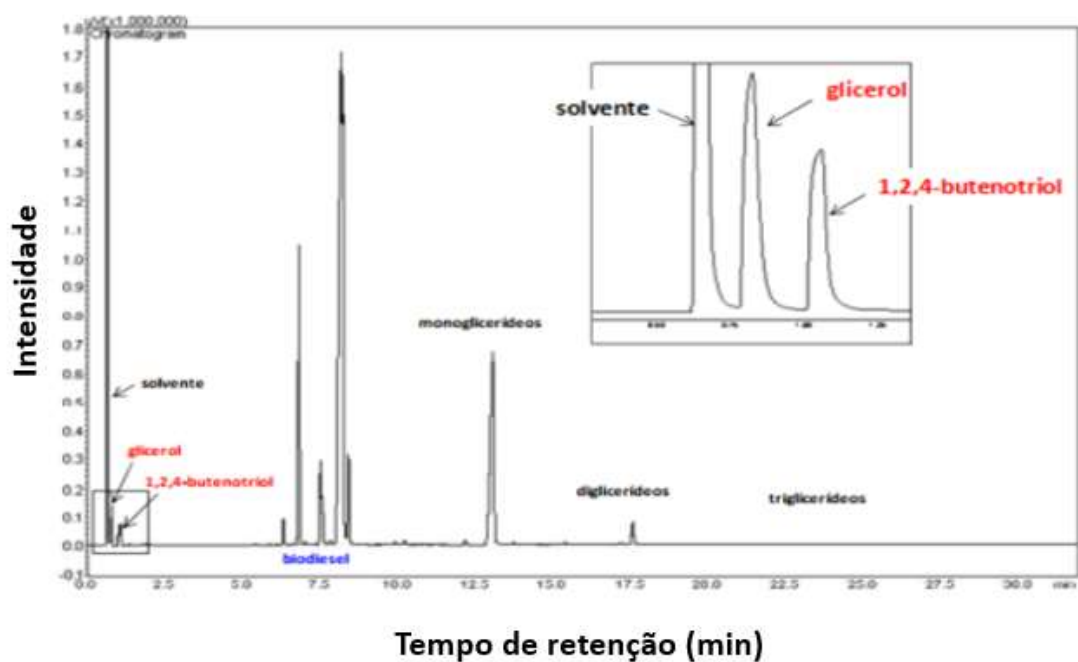
ANEXO A:

Cromatograma de amostra comercial padrão contendo monooleína, dioleína e trioleína.



Fonte: adaptado de Rosset (2011).

Cromatograma mostrando os sinais de amostra comercial contendo monooleína, 1,3 – dioleína e trioleína (PIs).

ANEXO B:**Cromatograma de amostra contendo biodiesel.**

Fonte: adaptado de Rosset (2011).

Cromatograma do biodiesel, antes da lavagem com água, mostrando os sinais do glicerol e do 1,2,4 – butenotriol (PI).



EESC • USP