

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
CÂMPUS APUCARANA/LONDRINA**

VIVIAN DE OLIVEIRA LIMA

**PRÉ-TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CURTUME POR BACTÉRIAS
E ENZIMA LIPOLÍTICAS**

DISSERTAÇÃO

**LONDRINA
2015**

VIVIAN DE OLIVEIRA LIMA

**PRÉ-TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CURTUME POR BACTÉRIAS
E ENZIMA LIPOLÍTICAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Engenharia
Ambiental, do Programa de Pós-graduação em
Engenharia Ambiental, da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ajadir Fazolo

Coorientadora: Prof^a. Dra. Katia Valéria
Marques Cardoso Prates

**LONDRINA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

L732p Lima, Vivian de Oliveira
Pré-tratamento de efluente de curtume por bactérias e enzima lipolíticas /
Vivian de Oliveira Lima. - Londrina: [s.n.], 2015.
90 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ajadir Fasolo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Katia Valéria Marques Cardoso Prates.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2015.

Bibliografia: f. 75-80.

1. Curtumes - Poluição. 2. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico. 3. Lipase. I. Fasolo, Azadir, orient. II. Prates, Katia Valéria Marques Cardoso, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

CDD: 628



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pró-reitora de Pesquisa e Pós Graduação
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Campus Apucarana/Londrina



TERMO DE APROVAÇÃO

PRÉ-TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CURTUME POR BACTÉRIAS E ENZIMA LIPOLÍTICAS

por

Vívian de Oliveira Lima

Dissertação de mestrado apresentada no dia sete de julho de 2015 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr Ajadir Fazolo - Orientador
(UTFPR)

Prof^(a). Dr^(a) Simone Damasceno Gomes - Membro Titular
(UNIOESTE)

Prof. Dr. Ricardo Nagamine Costanzi - Membro Titular
(UTFPR)

Prof. Dr Edson Fontes de Oliveira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador, Prof. Dr. Ajadir Fazolo, que me recebeu na instituição e acreditou em meu potencial. Por estar sempre presente nos momentos de dúvida, de trabalho e de alegrias. Pelos conselhos profissionais e pessoais que recebi e pela paciência ao longo desses dois anos de trabalho. À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates que muito contribuiu para meu crescimento profissional e intelectual. Por disponibilizar seu laboratório e permitir me aprofundar em técnicas e teorias da biologia. À coordenação do curso pelo esforço em nos garantir ensino de qualidade e melhorias na estrutura da universidade, tanto física quanto financeira.

Agradeço também ao meu marido por sempre compreender a importância e o tempo dedicado a esse trabalho. Por ter estado ao meu lado em todos os momentos. Agradeço pelas lutas que travamos juntos e pelas conquistas que tivemos nesse período.

Aos meus pais e irmãos por serem sempre um exemplo de honestidade, esforço, humildade e fé. Por entenderem a necessidade da distância e as poucas vezes que nos reunimos. Por torcerem sempre pelo meu sucesso.

Agradeço aos amigos que fiz na instituição pelo acolhimento no laboratório, pelo ambiente de amizade, pelas ajudas, pelas conversas, pela simples presença e saber que poderia contar com todos a qualquer momento.

RESUMO

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

As águas residuárias industriais possuem propriedades físico-químicas distintas, sendo necessários estudos específicos para a escolha do tratamento de cada efluente visando garantir maior eficiência e atendimento aos requisitos ambientais. Diversas indústrias, dentre elas o Curtume, potencialmente, geram efluentes com elevado teor de óleos e gorduras (O&G). Tais compostos podem causar problemas operacionais e interferir no desempenho dos sistemas biológicos de tratamento. Por esse motivo, a remoção preliminar de O&G, em geral, é recomendada. A hidrólise enzimática de lipídios tem se mostrado promissora no pré-tratamento de águas residuárias como alternativa ao uso de métodos físico-químicos. O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias lipolíticas do efluente da graxaria de curtume, aplicá-las no pré-tratamento deste efluente em escala laboratorial e comparar seus efeitos com o uso do produto comercial Enzilimp[®] e com enzima LPP (lipase de pâncreas de porco - Sigma Aldrich[®]). Foram isoladas 14 cepas produtoras de lipase. A cepa MOV7 (estafilococo positivo), que apresentou maior índice enzimático, foi utilizada nos ensaios. Foram realizados três ensaios preliminares com o intuito de avaliar o perfil temporal e a influência da concentração dos inóculos, dos efeitos da diluição do efluente e da aeração. Posteriormente realizou-se o DCCR avaliando a influência da temperatura, da concentração do inóculo, da concentração do efluente e do pH para as variáveis respostas DQOt, DQOs, O&G e Índice de Acidez ao longo de 48 horas em sistema fermentativo e posteriormente 24 horas em sistema aerado. Ao final do experimento concluiu-se que o efluente da graxaria do curtume é fonte potencial de bactérias lipolíticas e que tais cepas isoladas apresentam comportamento semelhante ao Enzilimp[®]. Após 72 horas de experimento (48 horas em período fermentativo e 24 horas em sistema aerado) foram alcançadas remoções de 75% de O&G e 47% de DQOt com MOV7 e 52% de O&G e 30% DQOt com a enzima LPP. A enzima LPP provocou aumento de 1,1g de DQOt por g de enzima adicionada. Quando in natura, o aumento da concentração dos inóculos não resultou em melhoria do tratamento. Porém, a diluição do efluente favoreceu a redução dos parâmetros DQO, O&G e IA para os diferentes inóculos. A aeração favoreceu a redução da matéria orgânica nas diluições entre 12,5 e 62,5 mL.L⁻¹. Observou-se que a temperatura e pH influenciaram significativamente o desempenho do sistema com melhores resultados a 30°C e 8,0, respectivamente.

Palavras-chave: Efluente de curtume. Pré-tratamento. Óleos e gorduras. Lipase. Bactéria lipolítica.

ABSTRACT

LIMA, Vivian de Oliveira. **Pretreatment of tannery's effluent by lipolytic bacteria and enzyme.** Dissertation (Master's degree in Engenharia Ambiental)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2015.

Industrial wastewaters present different physiochemical characteristics, requiring specific studies for choose the correct treatment for each effluent, ensuring more efficiency, taking into account environmental requirements. Many kinds of industries, including tannery, potentially produce effluents with high content of oil and grease (O&G). Those compounds can cause operational problems and interfere on the performance of biological treatment systems. For these reasons, in general, is recommended the preliminary removal of O&G. The enzymatic hydrolysis of lipids has proven promising in pretreatment of wastewaters like an alternative for physiochemical methods. The aim of this study was isolate microorganisms from tannery effluent able to produce extracellular lipase, apply them in the pretreatment in laboratorial scale of this effluent and compare their effects with the commercial product Enzilimp® and with PPL enzyme (porcine pancreas lipase Sigma Aldrich®). Were isolate 14 strains from tannery's effluent. The strain MOV7 (positive staphylococci), that presented the greatest enzymatic index, was used on the tests. Were done three preliminary tests with the objective to evaluate the time and the influence from inoculum concentration, from effluent dilution and aeration. After, were made the DCCR to evaluating the influence from temperature, inoculum and effluent concentration, and pH on the variables responses CODt, CODs, O&G e Acid Index during 48 hours in fermentation system and 24 hours after in aerobic system. In the end of the tests were concluded that the tannery effluent is a potential source of lipolytic bacteria and those strains have similar behavior to Enzilimp®. During 72 hours (48 hours in fermentative conditions and 24 in aerated conditions) the pretreatment reached the reduction of 75% of O&G and 47% of CODt with MOV7 and 52% of O&G and 30% with PPL enzyme. The PPL enzyme caused the increasing of 1,1g CODt on each gram from added enzyme. When in natura, the increasing of inoculum concentration gave no better results on treatment. However, the effluent dilution promoted the decreasing of parameters COD, O&G and AI for the different inoculums. The aeration was effective on reduction from organic matter in dilutions between 12,5 and 62,5 mL.L⁻¹. Was observed that the temperature and pH influenced significantly the system's work with better results on 30°C and 8,0, respectively.

Keywords: Tannery effluent. Pretreatment. Oil and grease. Lipase. Lipolytic bacteria

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do desenho experimental	25
Figura 2 - Fluxograma da etapa de ribeira do curtume do município de Rolândia, PR.	26
Figura 3 - Resumo da metodologia aplicada para obtenção de micro-organismos lipolíticos e produção de inóculo.....	27
Figura 4 - Representação esquemática da técnica de espalhamento em placa de micro-organismos das amostras de efluente do curtume. MGA: meio de cultura contendo gordura animal; MOV: meio de cultura contendo óleo vegetal.....	28
Figura 5 – Agitador incubador: sistema fermentativo	32
Figura 6 – Sistema de aeração e banho maria para controle da temperatura.....	32
Figura 7 - Análise de teor de O&G pelo método de extração por hexano	35
Figura 8 Fotografia (A) Morfologias encontradas nas colônias bacterianas isoladas, (B) bacilo gram negativo, (C) estafilococo gram positivo, (D) bacilo gram positivo, (E) estreptobacilo gram positivo (F) e estafilococo negativo	39
Figura 9 - Colônia bacteriana cultivada em meio Tween 20 ágar para teste da produção de lipase. Halo de crescimento da colônia (hC), halo de degradação da lipase (hD).....	39
Figura 10 - Esgotamento em meio de cultura CHROMagar™ Orientation das cepas produtoras de lipase	40
Figura 11 - Variação temporal da DQO total para MOV4, MOV7 e Enzilimp® no primeiro ensaio preliminar	42
Figura 12 - Variação temporal do teor de óleos e graxas para MOV4, MOV7 e Enzilimp® no primeiro ensaio preliminar.....	43
Figura 13 - Variação temporal do índice de acidez para MOV4, MOV7 e Enzilimp® no primeiro ensaio preliminar.....	43
Figura 14 - Valores da DQO total em função do tempo de ensaio e da concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar	45
Figura 15 - Valores da DQO solúvel em função do tempo de ensaio e da concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar	45
Figura 16 - Variação temporal da DQO total em função do tipo e da concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar	46
Figura 17 - Variação temporal da DQO solúvel em função do tipo e da concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar	46

Figura 18 - Valores da relação de DQOs/DQOt em função do tempo e do tipo e concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar	47
Figura 19 - Variação do teor de O&G dos testes com diferentes concentrações de inóculos no segundo ensaio preliminar	47
Figura 20 - Variação temporal do teor de O&G dos testes com diferentes concentrações de inóculos no segundo ensaio preliminar	48
Figura 21 - Variação do Índice de Acidez dos testes com diferentes concentrações de inóculos no segundo ensaio preliminar	49
Figura 22 - Variação temporal do Índice de Acidez dos testes com diferentes concentrações de inóculos no segundo ensaio preliminar	49
Figura 23 – Valores de DQO total em função do inóculo e do tempo de experimento no terceiro ensaio preliminar contendo efluente de curtume diluído	51
Figura 24 - Valores de DQO solúvel em função do inóculo e do tempo de experimento no terceiro ensaio preliminar contendo efluente de curtume diluído	52
Figura 25 – Variação de O&G no terceiro ensaio preliminar contendo efluente de curtume diluído.....	54
Figura 26 - Variação global (0h-72h) do teor de O&G quando utilizado efluente <i>in natura</i> (segundo ensaio preliminar) e diluído (terceiro ensaio preliminar)	54
Figura 27 - Variação do índice de acidez no terceiro ensaio preliminar contendo efluente de curtume diluído.....	55
Figura 28 - Valores iniciais de DQOt e DQOs nos ensaios de DCCR inoculados com MOV7 e Enzima LPP	58
Figura 29 - Variação da DQOt nos ensaios de DCCR conduzidos com inóculo bacteriano (MOV7)	58
Figura 30 - Variação da DQOt nos ensaios de DCCR com inóculo enzimático (LPP)	58
Figura 31 - Curva de contorno da variação global da DQO total em função da concentração do inóculo e da temperatura para MOV7	60
Figura 32 - Curva de contorno da variação global da DQO total em função da concentração do inóculo e do pH para MOV7	60
Figura 33 - Curva de contorno da variação global da DQO total em função da concentração do inóculo e da temperatura para enzima LPP	61
Figura 34 - DQOs inicial e sua variação ao longo do tempo para os ensaios de DCCR inoculados com MOV7.....	62

Figura 35 - DQOs inicial sua variação ao longo do tempo nos ensaios de DCCR inoculados com enzima LPP.....	62
Figura 36- Curva de contorno da variação global da DQO solúvel em função do pH e da temperatura para MOV7.....	63
Figura 37 - Curva de contorno da variação global da DQO solúvel em função da concentração do inóculo e da temperatura para enzima LPP.....	63
Figura 38 - Concentração inicial de O&G dos ensaios de DCCR inoculados com MOV7 e enzima LPP.....	65
Figura 39 – Variação de O&G dos ensaios de DCCR conduzidos com MOV7.....	65
Figura 40 - Variação de O&G dos ensaios de DCCR conduzidos com enzima LPP.....	65
Figura 41 - Curva de contorno da variação global de O&G em função do pH e da concentração do inóculo para MOV7.....	66
Figura 42 - Curva de contorno da variação global de O&G em função da concentração do efluente e da concentração do inóculo para a enzima LPP.....	66
Figura 43 - Curva de contorno da variação global de O&G em função do pH e da concentração do inóculo para a enzima LPP.....	67
Figura 44 - Curva de contorno da variação global de O&G em função do pH e da concentração do efluente para a enzima LPP.....	67
Figura 45 - Índice de Acidez inicial nos ensaios de DCCR inoculados com MOV7 e com Enzima LPP.....	69
Figura 46 - Variação do Índice de Acidez nos ensaios de DCCR inoculados com MOV7 ao longo do pré-tratamento.....	69
Figura 47 - Variação do Índice de Acidez dos ensaios de DCCR inoculados com Enzima LPP ao longo do pré-tratamento.....	69
Figura 48 - Curva de contorno da variação global do IA em função da concentração do inóculo e da temperatura para MOV7.....	70
Figura 49 - Curva de contorno da variação global do IA em função da diluição do efluente e da temperatura para MOV7.....	70
Figura 50 - Curva de contorno da variação global do IA em função do pH e da temperatura para MOV7.....	71
Figura 51 - Curva de contorno da variação global do IA em função da concentração do inóculo e da temperatura para enzima LPP.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de óleos e gorduras (O&G) em diferentes efluentes industriais. *Variação temporal da concentração, valor máximo obtido. **Valor de ácidos graxos voláteis	18
Tabela 2 - Caracterização físico-química da água residuária obtida da caixa de gordura de curtume	26
Tabela 3 - Composição do meio de cultura para espalhamento e esgotamento de micro-organismos.....	27
Tabela 4 - Composição do meio de cultura para realização do teste da lipase.....	29
Tabela 5 - Composição do meio da solução nutritiva utilizada no preparo do inóculo	30
Tabela 6 - Ensaio preliminares.....	30
Tabela 7 - Valores codificados e reais das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental	33
Tabela 8 - Identificação das condições aplicadas em cada um dos ensaios	34
Tabela 9 - Índice enzimático das colônias bacterianas com resultado positivo para o teste de lipase. Morfologia: Bacilo gram negativo (B -), Estafilococo gram positivo (EC+), Estreptobacilo gram positivo (EB+)	40
Tabela 10 - Resultado dos testes bioquímicos de catalase, motilidade (MIL) e tríplex açúcar ferro (TSI).....	40
Tabela 11 - Variação percentual (V%) da DQOt e DQOs, Comparação dos ensaios conduzidos com efluente <i>in natura</i> (segundo ensaio preliminar) e aqueles conduzidos com efluente diluído (terceiro ensaio preliminar)	52
Tabela 12 - Variação percentual (V%) do IA. Comparação dos ensaios conduzidos com efluente <i>in natura</i> (segundo ensaio preliminar) e aqueles conduzidos com efluente diluído (terceiro ensaio preliminar)	55
Tabela 13 - Condições para validação do modelo, variação global dos resultados esperados e obtidos com inóculo MOV7	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônio
(v/v)	Volume por volume
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AGV	Ácidos graxos voláteis
B (-)	Bacilo Gram negativo
BHI	Meio de cultura líquido <i>Brain Heart Infusion</i>
CaCl_2	Cloreto de cálcio
C_I	Concentração do inóculo
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCCR	Delineamento Compostos Central Rotacional
D_E	Diluição do efluente
DQO	Demanda química de oxigênio
DQOs	Demanda química de oxigênio solúvel
DQOt	Demanda química de oxigênio total
EB (+)	Estreptobacilo Gram positivo
EC (+)	Estafilococo Gram positivo
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
F	Fator de correção
Fcal	F calculado
Ftab	F tabelado
hC	Halo de crescimento
hD	Halo de degradação
IA	Índice de acidez
IE	Índice enzimático
KH_2PO_4	Fosfato de potássio
LPP	Lipase de pâncreas de porco
M	Molaridade
MGA	Meio de cultura com gordura animal
MgSO_4	Sulfato de Magnésio
MIL	Motilidade Indol Lisina
MOV	Meio de cultura com óleo vegetal

MOV4	Cepa bacteriana 4 isolada no meio MOV
MOV7	Cepa bacteriana 7 isolada no meio MOV
mS	Milisiemens
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl
O&G	Óleos e gorduras
O/W	Emulsão óleo em água
OD	Oxigênio dissolvido
p/v	Peso por volume
rpm	Rotações por minuto
ST	Sólidos totais
STF	Sólidos totais fixos
STV	Sólidos totais voláteis
TSI	Tríplice açúcar ferro
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
W/O	Emulsão água em óleo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Lipídios: conceitos básicos.....	17
3.2 Características de efluente lipídico.....	18
3.3 Curtumes.....	19
3.4 Tratamentos convencionais de efluente lipídico	20
3.5 Pré-tratamento enzimático.....	22
3.6 Pré-tratamento microbiológico	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Água residuária estudada.....	26
4.2 Procedimento experimental	26
4.2.1 ETAPA1 - Obtenção de micro-organismos lipolíticos e produção de inóculo	26
4.2.1.2 Teste de lipase	28
4.2.1.3 Identificação prévia dos micro-organismos.....	29
4.2.2 ETAPA 2 – Ensaios preliminares.....	30
Os inóculo MOV4 e MOV7 de 1%, 5% e 10% (v/v) correspondem à 10, 50 e 100 mL.L ⁻¹	30
As concentrações de enzima LPP de 1%, 3% e 5% (p/v) corresponde à 10, 30 e 50 g.L ⁻¹	30
4.2.2.1 Inóculos utilizados.....	30
4.2.2.2 Protocolo experimental.....	31
4.2.3 ETAPA3 – Pré-tratamento do efluente com bactéria MOV7 e enzima LPP.....	33
4.3 Monitoramento físico químico	34
4.4. Análises estatísticas	36
4.5. Variáveis calculadas a partir do monitoramento	36

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Caracterização físico-química do efluente	38
5.2 Etapa 1 - Obtenção de micro-organismos lipolíticos a partir de efluente de curtume.....	38
5.3 Etapa 2 – Ensaio preliminares.....	41
5.3.1 Ensaio 1 – Determinação do tempo de duração dos ciclos.....	41
5.3.2 Ensaio 2 - Influência da concentração dos inóculos MOV7, Enzilimp [®] e enzima LPP..	44
5.3.3 Ensaio 3 Influência da diluição do efluente e da aeração.....	51
5.4 Etapa 3 - Efeitos do pH, temperatura, concentração de inóculo e diluição do efluente no pré-tratamento do efluente de curtume	56
5.4.2 Teor de Óleos e Gorduras	64
5.4.3 Índice de Acidez	68
5.5 Validação dos modelos.....	71
5 CONCLUSÕES	73
6 SUGESTÕES.....	74
REFERÊNCIAS	75
APENDICES	81

1 INTRODUÇÃO

As águas residuárias industriais possuem propriedades físico-químicas distintas, sendo necessários estudos específicos para a escolha do tratamento de cada efluente garantindo o atendimento dos requisitos ambientais. Laticínios, abatedouros, curtumes, refinarias, produtoras de óleos vegetais (soja, girassol, oliva, etc.), biodiesel, entre outros, possuem em comum a produção de água residuária com elevado teor de óleos e/ou gorduras (O&G). Esse efluente é característico por trazer sérios problemas aos sistemas biológicos de tratamento. Em sistemas aeróbios, por exemplo, o excesso de lipídios pode ser adsorvido pelo lodo, provocando redução das trocas gasosas, menor acesso aos substratos e, possivelmente, tornar o processo menos eficiente. O excesso dessas substâncias na água aumenta a demanda bioquímica de oxigênio, além de formar um filme sobre a água – visível ou não pelo fenômeno da iridescência – que reduz as trocas gasosas no corpo d'água, prejudicando todo o ecossistema.

Os curtumes, setor industrial que tem crescido no país nos últimos anos, destacam-se pelo volume de efluente gerado em sua etapa inicial do processo produtivo – a ribeira. Esta etapa, que precede as fases de curtimento e acabamento do couro, tem por objetivo promover a eliminação de impurezas aderidas, como gordura, músculo e pelos e prepara a matriz de fibras colágenas para reagir com os produtos químicos das etapas seguintes. O volume de efluente líquido originado nesta etapa (7 a 25 m³.ton⁻¹ de couro processado) é aproximadamente 70% do total gerado no processo produtivo. Essas águas apresentam características como alcalinidade, cor esbranquiçada devido ao excesso de cal, presença de pelos, tecido muscular, sangue e um elevado teor de gordura animal.

Para reduzir o teor de O&G das águas residuárias vem-se discutindo ao longo da última década, o uso de enzimas microbianas como alternativa para o tratamento desses efluentes. As lipases são enzimas que promovem a hidrólise dos lipídios, quebrando as ligações éster carboxílicas, liberando ácidos graxos e glicerol, que são moléculas mais facilmente degradáveis pelos micro-organismos. A síntese de lipase pelos micro-organismos é influenciada por diversos fatores ambientais, dentre eles destacam-se a temperatura de incubação e o pH.

Para aumentar a competitividade dos processos biotecnológicos é preciso intensificar pesquisas de novas cepas microbianas que melhor se adaptam às características específicas do efluente em estudo. Além disso, é preciso verificar metodologias operacionais capazes de assegurar uma eficiência máxima, com baixo custo e elevada reprodutibilidade. O

planejamento e a otimização de processos são etapas determinantes para obtenção de resultados satisfatórios.

Neste trabalho buscou-se avaliar o desempenho de organismos isolados, produto comercial Enzilimp[®] e enzima lipase pancreática de porco (LPP Sigma[®]), submetidas a diferentes condições operacionais, aplicadas ao tratamento preliminar de efluente de graxaria de curtume.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar alternativas de pré-tratamento de efluente de graxaria de curtume, por meio da aplicação de bactérias lipolíticas e da enzima LPP (lipase de pâncreas de porco).

2.2 Objetivos Específicos

- (i) isolar micro-organismos lipolíticos a partir do efluente da graxaria de curtume;
- (ii) avaliar o comportamento dos micro-organismos isolados, inoculados no efluente em sistema de pré-tratamento;
- (iii) comparar o desempenho dos inóculos de micro-organismos isolados, do produto comercial Enzilimp[®] e da lipase de pâncreas de porco (LPP) no tratamento preliminar do efluente;
- (iv) determinar os efeitos de diferentes concentrações de inóculos, diluições do efluente, temperatura, pH e aeração na remoção e conversão da DQO, teor de O&G e índice de acidez.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lipídios: conceitos básicos

Os lipídios biológicos constituem um grupo de compostos que, apesar de quimicamente diferentes entre si, exibem, como característica comum, devido a sua natureza apolar, a insolubilidade em água (LEHNINGER, NELSON E COX, 2002).

Lipídios são moléculas orgânicas, hidrofóbicas, classificadas como: ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteroides. Os triacilgliceróis são as moléculas lipídicas mais abundantes na natureza, constituídas de três ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol. Os triacilgliceróis são armazenados e utilizados como reserva energética, uma vez que, por serem moléculas altamente reduzidas, sua oxidação libera mais energia que a oxidação de quantidades equivalentes de carboidratos ou proteínas (VOET E VOET, 2006; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008; ALBERTS et al., 2010).

O estado físico e a facilidade de degradação dos óleos e gorduras dependem diretamente de sua estrutura molecular. Os triacilgliceróis de origem animal possuem ácidos graxos saturados, isto é, em sua cadeia carbônica todos os carbonos estão saturados ligando-se a átomos de hidrogênio, havendo, assim, apenas ligações simples em sua estrutura molecular. Essa configuração permite maior estabilidade e compactação da molécula, permitindo seu estado sólido à temperatura ambiente. Já os triacilgliceróis de origem vegetal possuem ácidos graxos insaturados. Cadeias insaturadas apresentam carbonos que realizam duplas ligações, gerando torções na molécula. Essa segunda configuração é mais instável e menos compacta, apresentando estado líquido à temperatura ambiente (MARZZOCO E TORRES, 1999; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008; ALBERTS et al., 2010).

De acordo com Metcalf e Eddy (2003) os principais compostos orgânicos presentes nas águas residuárias são constituídos por óleos e gorduras, além de carboidratos e proteínas. O termo graxa inclui gorduras, óleos e ceras e outros constituintes das águas residuárias. As gorduras estão entre os compostos orgânicos mais estáveis e não são facilmente decompostos pelas bactérias.

Do ponto de vista analítico, a determinação de óleo e gordura (O&G) não mede a quantidade absoluta de uma substância específica. Em vez disso, grupos de substâncias com características físicas semelhantes são determinados quantitativamente, com base na sua solubilidade em um solvente de extração orgânico. Assim, o teor de O&G é definido como

qualquer material extraído pelo solvente, a partir de uma amostra acidificada e não volatilizada durante a evaporação do solvente (APHA, 2005).

3.2 Características de efluente lipídico

Residências, restaurantes e outros estabelecimentos comerciais geram efluente que contém quantidades significativas de óleos e gorduras (O&G). Esses compostos orgânicos provêm, principalmente, da limpeza de utensílios e de restos alimentares. Os efluentes industriais também podem conter elevada carga orgânica devido à presença de compostos lipídicos (OLIVEIRA et al., 2014). Laticínios, abatedouros, curtumes, refinarias, produtoras de óleos vegetais (soja, girassol, oliva, etc.) e biodiesel, por exemplo, são indústrias geradoras de efluente com elevadas concentrações de O&G (MASSE, KENNEDY E CHOU, 2001; EL-BESTAWY, EL-MASRY, EL-ADL, 2005; RAMANI, CHOCKALINGAM, SEKARAN, 2010; PRASAD E MANJUNATH, 2011; ROCHA et al., 2013). Os lipídios se caracterizam como um dos principais componentes orgânicos de águas residuárias, juntamente com proteínas e carboidratos (PEREIRA et al., 2006) e sua concentração nessas águas é muito variável e dependem das características industriais, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Teor de óleos e gorduras (O&G) em diferentes efluentes industriais. *Variação temporal da concentração, valor máximo obtido. **Valor de ácidos graxos voláteis

Indústria	Teor de O&G (mg.L ⁻¹)	Fonte
Laticínio	4680*	Mendes, Pereira e Castro, 2006
	640*	Alberton et al., 2010
	3100	Mendes, Pereira e Furigo, 2010
	219	Mahdi, Bhattacharya e Gupta, 2012
Processamento de peixe	711	Valente et al., 2010
	1470 ± 1188	Alexandre et al., 2011
	2808*	Cristóvão et al., 2014
Processamento de carne	605	Zawadzki et al., 2013
Abatedouro avícola	<10	Valladão, Cammarota e Freire, 2010
	2403 ± 521	Damasceno, Cammarota e Freire, 2012
	540**	Rajakumar et al., 2012
	2005	Dors et al., 2013
Fábrica de biodiesel	6760	Rocha et al., 2013
Cozinha de hospital	21000	Mongkolthananaruk e Dharmstithi, 2002
Curtume	2339	El-Bestawy et al., 2013
Indústria de Óleo de Palma	8020	Vijayaraghavan, Ahmad e Aziz, 2007

Águas residuárias com essas características, quando lançados em sistemas de tratamento convencional podem gerar problemas operacionais, reduzindo a eficiência e/ou entupindo tubulações de distribuição e aeração, danificando o sistema. Em sua maior parte,

esses efluentes são lançados no corpo hídrico ou dispostos no solo sem receber tratamento adequado (OLIVEIRA et al., 2014).

O despejo de óleos e gorduras em corpos d'água provoca sérios danos a esse ecossistema. Além de aumentar a demanda química de oxigênio (DQO), também pode provocar a formação de filmes na superfície aquática que reduz a difusão de oxigênio da atmosfera para a água, reduzindo os níveis de oxigênio dissolvido (OD), podendo provocar a morte de peixes e outros organismos aeróbios (MONGKOLTHANARUK & DHARMSTHITI, 2002; MENDES E CASTRO, 2005). Para reduzir tais riscos e manter o padrão de qualidade das águas, resoluções como a CONAMA 430/2011 e 357/2005 definem que o padrão de lançamento máximo permitido de óleos vegetais e gorduras animais presentes em águas residuárias é de 50 mg L^{-1} , desde que rios classe 2 apresentem ausência virtual de O&G.

3.3 Curtumes

Os curtumes são exemplos de empresas que geram efluente com elevada carga orgânica, em algumas condições devido ao excesso de gordura. Esse ramo empresarial se destaca no Brasil como importante fonte poluidora, pois possui, segundo a ABIEC (2014), o maior rebanho comercial do mundo, com 213,3 milhões de cabeças de gado de corte. O aumento da criação bovina para produção de carne no país favorece o crescimento das indústrias de beneficiamento de couro (BRAZILIAN LEATHER, 2013). Os curtumes têm se destacado também no cenário industrial nacional devido ao seu crescimento produtivo e econômico. Entre os anos de 2000 e 2012 a produção de couro bovino aumentou 33%, atingindo em 2012 a produção de 40 milhões de couros, representando 12,7% de toda a produção mundial. Dados de 2011 revelam que mais da metade do couro produzido no Brasil é direcionado para a fabricação de móveis e calçados (GUIA BRASILEIRO DO COURO, 2014).

Para que o couro acabado chegue ao mercado consumidor, a pele animal passa por diversos processos divididos em três etapas principais: ribeira, curtimento e acabamento. Na etapa de ribeira ocorre a eliminação de impurezas aderidas à pele como gordura, músculo e pelos, realiza-se recortes das extremidades das peles e prepara a matriz de fibras colágenas para reagir adequadamente com os produtos químicos das etapas seguintes. O volume de efluente líquido originado nesta etapa ($25 \text{ a } 30 \text{ m}^3 \text{ ton}^{-1}$ de couro processado) é aproximadamente 70% do total gerado no processo produtivo. Essas águas apresentam

características como alcalinidade, cor esbranquiçada devido ao excesso de cal, presença de pelos, tecido muscular, sangue e elevado teor de gordura animal emulsionada. (CETESB, 2005).

3.4 Tratamentos convencionais de efluente lipídico

Considera-se que o tratamento de águas residuárias, utilizando processos físicos ou biológicos (aeróbios ou anaeróbios), deve promover a remoção de matéria orgânica, degradação de compostos químicos recalcitrantes e fornecer um efluente que não afete o equilíbrio do receptor final (MENDES et al., 2005). Os tratamentos de águas residuárias mais utilizados no Brasil são divididos em físico-químicos e biológicos. No primeiro caso ocorre a remoção de contaminantes por ação de processos físicos e químicos que separam, em geral, uma fase sólida da líquida. Já os tratamentos biológicos utilizam micro-organismos na conversão e consumo de matéria orgânica poluente, podendo ser um processo aeróbio ou anaeróbio (TAE, 2015). Os processos aeróbios de tratamento estabilizam a matéria orgânica mais rapidamente comparado aos sistemas anaeróbios. Além disso, bactérias anaeróbias são mais susceptíveis à inibição por um grande número de compostos (Chernicharo, 1997).

No efluente, as moléculas de lipídios podem se apresentar em uma forma emulsionada. Uma emulsão consiste em uma solução que contém dois líquidos não miscíveis, neste caso a água e o óleo, no qual um fica disperso sob a forma de gotículas esféricas. Um sistema em que se encontram gotículas de óleo dispersas em água é denominado de emulsão óleo em água (O/W). Já uma solução que apresenta gotículas de água dispersas em um meio com óleo é denominado emulsão água em óleo (W/O) (McCLEMENTS E DECKER, 2000).

A remoção inicial dos lipídios não emulsionados em efluente industrial é feita, em geral, por meio de caixa separadora de gordura com remoção mecânica. Nesse sistema a água residuária, contendo matéria orgânica e outros sólidos, é liberada dentro da caixa, e a gordura, menos densa, permanece na superfície do tanque enquanto os compostos sólidos tendem a sedimentar. A água é então transferida para outra caixa subsequente passando por uma abertura inferior. Para o melhor funcionamento dessas caixas deve-se evitar temperaturas superiores a 35°C e valores de pH acima de 8,5, condições que favoreceriam a saponificação e emulsificação da gordura. Temperaturas muito baixas também devem ser evitadas para não haver solidificação da gordura, principalmente as de origem animal (MENDES et al., 2005; VALLADÃO, FREIRE E CAMMAROTA, 2007).

Outras técnicas podem ser aplicadas para remoção de gordura não emulsionada. Métodos físico-químicos, como a flotação por produtos químicos ou ar dissolvido, são os mais empregados. Neste processo, ocorre a remoção de gorduras por flotação. Em alguns casos, para elevar a porcentagem de remoção de gordura é necessário encaminhar esses efluentes para tratamentos biológicos. Entretanto é preciso estar atento, uma vez que a adição dos sais coagulantes podem inibir a ação microbiana nas etapas seguintes (MENDES et al., 2005; CAMMAROTA E FREIRE, 2006).

Os tratamentos biológicos anaeróbios consistem na decomposição da matéria orgânica realizada por bactérias que não utilizam oxigênio para sua respiração. Nesses sistemas de degradação, os compostos orgânicos são convertidos em moléculas menores, destacando-se o metano e o gás carbônico. Quando efluentes lipídicos são lançados nesses sistemas podem provocar a desestabilização e redução da eficiência do tratamento, uma vez que favorece a formação de lodo com baixa atividade devido à adsorção da gordura ao floco, o que aumenta a resistência de transferência de massa. Trabalhos como os de Hwu e colaboradores (1998) e Sam-Soon e colaboradores (1991) demonstraram que em reatores UASB a produção de metano não era equivalente à redução de DQO nos primeiros dias de estudo. Essa desproporção era causada pela adsorção de ácidos graxos nos flocos de lodo ao invés de sua biodegradação. O efluente com excesso de carga lipídica também pode provocar a formação de lodo com elevada tendência de flotação, devido ao acúmulo de gases.

O efluente com grandes concentrações de O&G também pode ser tóxico a organismos acetogênicos e metanogênicos devido ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) uma vez que o consumo desses substratos lipídicos pelas bactérias é baixo. A reação de decomposição de AGCL é termodinamicamente desfavorável, e o acúmulo de gás hidrogênio, liberado nas reações de encurtamento de suas cadeias, afeta o equilíbrio das reações de degradação (RINZEMA, 1993; HWU et al., 1998; CHAO, 1981 *apud* CHIPASA E MEDRZYCKA, 2006; JEGANATHAN, NAKHLA E BASSI, 2007).

Dentre os sistemas de tratamento biológico aeróbio, destaca-se o processo de lodo ativado. Seu funcionamento baseia-se no fornecimento de oxigênio para que os micro-organismos, que se organizam em flocos, degradem a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, gerando ao final do processo gás carbônico e água. Os flocos biológicos são constituídos por uma comunidade microbiana dinâmica. Esse procedimento ocorre em tanques aerados denominados reatores biológicos. O efluente degradado é lançado para um decantador secundário capaz de separar o lodo biológico da fase líquida, podendo ser controlado o descarte e o reaproveitamento do lodo conforme necessário (JUNG,

CAMMAROTA E FREIRE, 2002; GIORDANO, 2004; MORAIS, 2005). Nesses sistemas, o excesso de gordura e óleos pode reduzir a capacidade de trocas gasosas. A ausência de aeração adequada ocasiona o desenvolvimento de bactérias filamentosas que dificultam a sedimentação do lodo, prejudicando por fim o desempenho do sistema. (CAMMAROTA E FREIRE, 2006; JUNG, CAMMAROTA E FREIRE, 2002). Além disso, alguns estudos demonstram que os lipídios são mais lentamente degradados pelos micro-organismos em comparação às outras moléculas orgânicas, aumentando o tempo de detenção hidráulica do sistema (CHIPASA E MEDRZYCKA, 2006).

Os curtumes brasileiros não possuem um sistema único de tratamento do efluente. É possível encontrar uma mescla de diferentes processos físico-químicos, biológicos anaeróbios e/ou biológicos aeróbios.

3.5 Pré-tratamento enzimático

Baseado nas dificuldades dos tratamentos de efluente convencionais na remoção de O&G, alguns trabalhos indicam a realização de pré-tratamento para a degradação dos compostos lipídicos, e posteriormente ser encaminhado para o tratamento biológico convencional (MENDES, PEREIRA E CASTRO 2006; ROSA, CAMMAROTA E FREIRE 2006; MOBARAK-QUAMSARI et al. 2012).

Ao contrário dos produtos químicos já utilizados nos tratamentos físico-químicos, o uso de enzimas tem possibilitado aumentar a eficiência de diversos processos industriais com risco menores de impacto ambiental. Isso ocorre devido à especificidade que as enzimas apresentam com seu substrato (MENDES et al., 2005).

As lipases, (glicerol éster hidrolase, E.C.3.1.1.3), são enzimas responsáveis por promover a hidrólise dos triacilgliceróis, atacando as ligações éster carboxílicas de forma sequencial dos grupos acila, liberando ácidos graxos e glicerol, que são moléculas mais facilmente degradáveis pelos micro-organismos. Essas enzimas atuam na interface orgânico aquosa e possuem um sítio ativo recoberto por uma cadeia peptídica de natureza hidrofóbica denominada de tampa. Quando a tampa encontra uma interface lipídio-água, há interação entre ambas e a tampa sofre alteração conformacional, modificando assim a estrutura quaternária da enzima, de uma forma fechada para uma forma aberta, expondo o sítio ativo e permitindo a catálise. Esse processo é conhecido como ativação interfacial, o qual aumenta a atividade lipolítica. (MENDES, PEREIRA E CASTRO, 2006; SIRISHA, RAJASEKAR E NARASU, 2010). As lipases também podem atuar no sentido inverso (síntese de acilgliceróis

por esterificação e transesterificação) dependendo da concentração de água no meio. O excesso de água garante manutenção da hidrólise. Em geral, as lipases não precisam de cofatores, atuam em ampla faixa de pH e são estáveis em temperaturas elevadas (HASAN, SHAH E HAMEED, 2006; MESSIAS et al., 2011).

A utilização dessas enzimas nos sistemas de pré-tratamento de águas residuárias além de ajudar na remoção de filmes oleosos em tubulações, aumentando a vida útil dos equipamentos, também proporciona redução de sólidos suspensos e triglicerídeos, garantindo melhores condições de tratamento em sistemas biológicos, uma vez que a ação microbiana será favorecida, tendo acesso às moléculas que são mais facilmente consumidas, tornando assim o tratamento mais eficiente (VALENTE et al., 2010). Trabalhos como o de Masse, Kennedy e Chou (2001) demonstram que o uso de enzimas no pré-tratamento de efluente lipídico com 2,5 a 3,0 g.L⁻¹ de O&G reduz em 60% o tamanho das partículas e o aumento da concentração de ácidos graxos livres, indicando a solubilização da gordura da água residuária de abatedouros.

O uso de lipase no tratamento de efluentes que apresentam elevada concentração de lipídios, como laticínios e abatedouros, tem se mostrado uma técnica promissora (RIBEIRO et al., 2005; Mendes, Pereira e Castro, 2006; Jeganathan, Bassi e Nakhla, 2006; Mendes, Pereira e Furigo, 2010; Valente et al., 2010; Alexandre et al., 2011).

3.6 Pré-tratamento microbiológico

Dentre as lipases utilizadas comercialmente, as de origem microbiana (bacteriana e fúngica) apresentam maior viabilidade comparada às de origem vegetal e animal. Isso devido à diversidade metabólica dos micro-organismos, a variedade de cepas produtoras existentes, a facilidade de manipulação gênica desses organismos, o rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo, além da maior estabilidade da enzima (WISEMAN, 1995 *apud* HASAN, SHAH E HAMEED, 2006). Apesar dos avanços tecnológicos, que possibilitam a obtenção de enzimas específicas, a seleção de micro-organismos selvagens produtores de lipase ainda é importante, uma vez que a aplicação de organismos geneticamente modificados no ambiente não é indicada por questões de biossegurança (ROSA, 2004).

A produção de lipase bacteriana é realizada em meio submerso de fermentação. Estudos observaram que os gêneros de bactérias lipolíticas que se destacam são: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Burkholderia* sp.. Esses micro-organismos apresentam pH ótimo próximo da neutralidade (pH=7), tanto para crescimento quanto para a

produção da enzima. A temperatura ótima para a produção de lipase corresponde com a temperatura ótima de crescimento das bactérias, que em geral encontra-se na faixa de 20-45 °C (SHARMA et al., 2002). O período de incubação necessário para atingir o máximo de produção de enzimas varia de acordo com a espécie, podendo ser de 12 até 96 horas. Observa-se que as lipases são produzidas ao longo de todo o crescimento bacteriano, mas atinge seu pico de produção na fase log tardia (GUPTA, GUPTA E RATHI, 2004).

Além do pH e da temperatura outros fatores ambientais interferem no crescimento e produção de enzima pelas bactérias. A fonte de carbono presente no meio de cultura, por exemplo, é um fator importante que permite a expressão da atividade lipásica. Sua produção depende da presença de indutores como triacilglicerois, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, tweens, sais biliares e glicerol (GHOSH et al. 1996; DHARMSTHITI et al. 1998; SHIRAZI et al. 1998; BRADDOO et al. 1999; RATHI et al. 2001 *apud* GUPTA, GUPTA E RATHI, 2004). Por isso, adicionam-se tais indutores ao meio de cultura sólido contendo ágar para verificar se uma colônia bacteriana é capaz ou não de produzir lipase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi dividida em três etapas principais, conforme apresentado na Figura 1.

Na primeira, buscou-se selecionar micro-organismos produtores de lipase a partir do efluente da graxaria de curtume. Depois de isolados, foram produzidos inóculos com as cepas que apresentaram melhor desempenho na degradação de lipídios. Também, foram preparados inóculos do produto comercial Enzilimp[®], de acordo com as orientações do fabricante.

Na segunda etapa foram realizados três ensaios preliminares, monitorando-se as variações temporais da DQOt, DQOs, teor de O&G e índice de acidez (IA), com o objetivo de definir o tempo de duração dos experimentos (ensaio1); o efeito de diferentes concentrações de inóculos bacterianos (ensaio 2); e a influência da diluição do efluente e da injeção de ar nas últimas 24 h de ciclo (ensaio 3).

A última etapa consistiu em testar o pré-tratamento do efluente por meio de delineamento composto central rotacional (DCCR) com 4 variáveis independentes (temperatura, concentração do inóculo, diluição do efluente e pH) avaliando as variáveis respostas, DQOt, DQOs, O&G e IA).

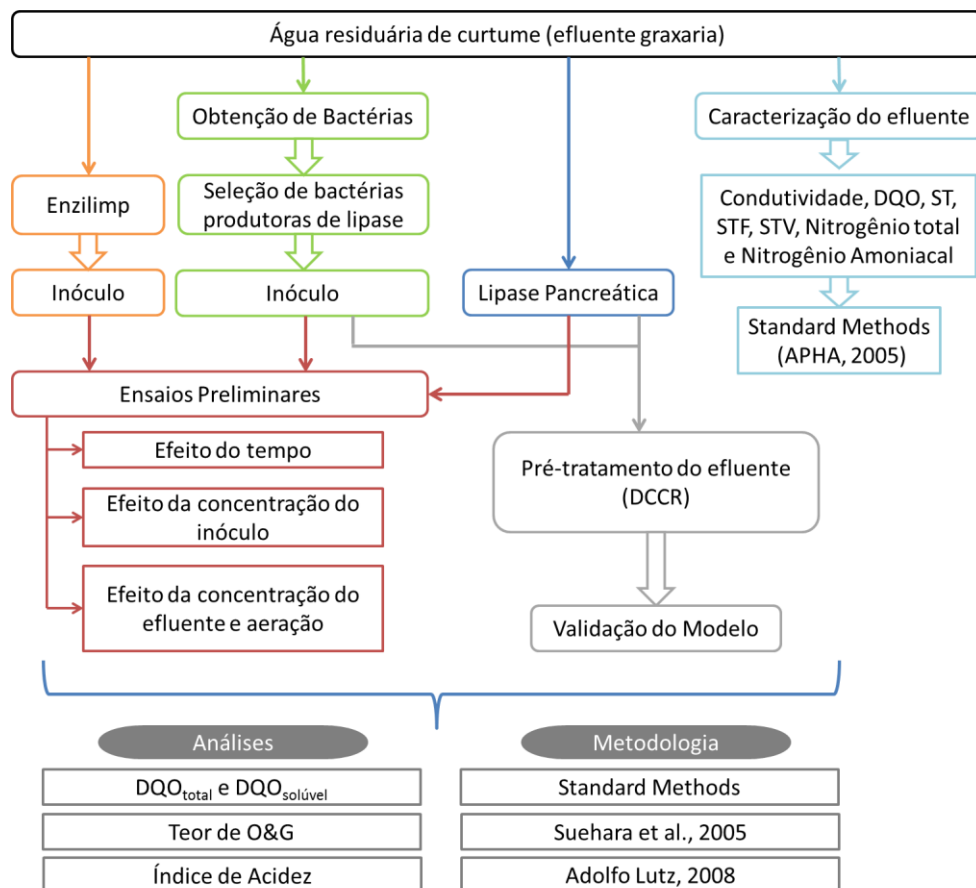


Figura 1 - Fluxograma do desenho experimental

4.1 Água residuária estudada

A água residuária utilizada nos experimentos foi obtida de um curtume localizado no município de Rolândia, PR e consiste de efluente segregado proveniente das etapas de pré-descarne do couro (Graxaria). As etapas do processo produtivo presentes nesse processo de limpeza da pele estão demonstradas na Figura 2. As amostras foram coletadas em dois pontos distintos – caixa de gordura e tridecanter – e armazenados em recipientes estéreis de polietileno, com volume de 5 (cinco) litros cada. As mesmas foram mantidas sob refrigeração, a 4°C no laboratório de Microbiologia da UTFPR campus Londrina. As principais características são apresentadas na Tabela 2.

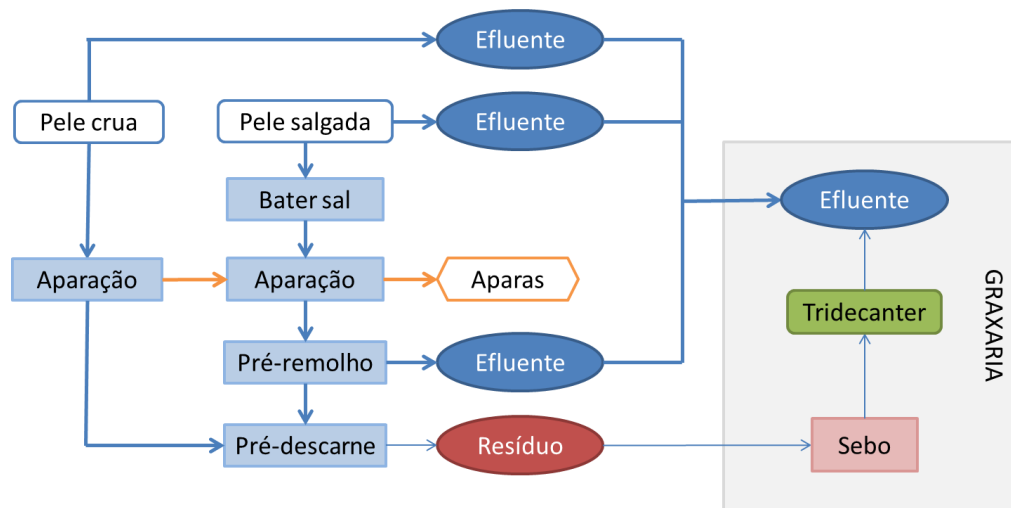


Figura 2 - Fluxograma da etapa de ribeira do curtume do município de Rolândia, PR.

Tabela 2 - Caracterização físico-química da água residuária obtida da caixa de gordura de curtume

pH	Temp. (°C)	Condutividade (mS.cm ⁻¹)	O&G (g.L ⁻¹)	NTK (gN.L ⁻¹)	N amoniacal (gN.L ⁻¹)	DQO (gO ₂ .L ⁻¹)	ST (g.L ⁻¹)	SF (g.L ⁻¹)	SV (g.L ⁻¹)
6,31	70	6,10	17,14	1,81	0,56	44-50	27,34	1,70	25,64

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 ETAPA1 - Obtenção de micro-organismos lipolíticos e produção de inóculo

O esquema do procedimento experimental utilizado encontra-se na Figura 3.

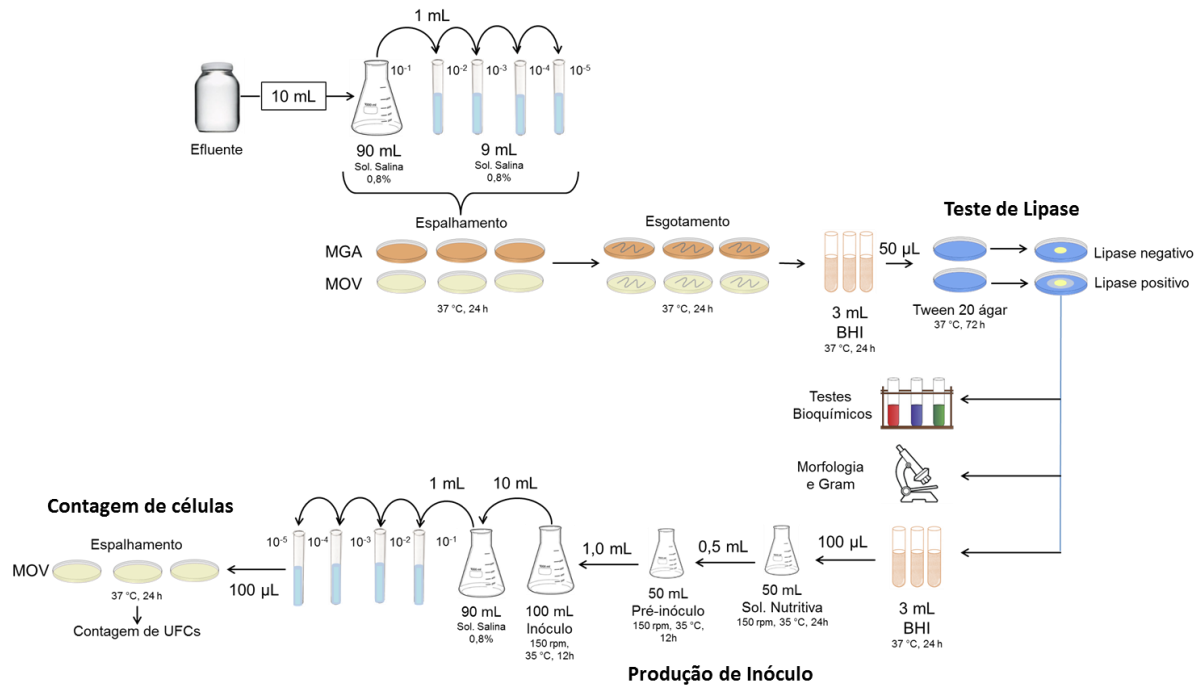


Figura 3 - Resumo da metodologia aplicada para obtenção de micro-organismos lipolíticos e produção de inóculo

4.2.1.1 Isolamento dos micro-organismos

O isolamento das bactérias foi realizado utilizando a técnica de diluição em série de amostras do efluente de curtume em solução salina 0,8%. Alíquotas de 100 μ L das diluições com concentração 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} foram inoculadas, por espalhamento, em placas de Petri contendo meio de cultura com óleo vegetal (MOV) ou gordura animal (MGA) (Tabela 3). As inoculações em placa foram realizadas em triplicata para cada diluição e cada meio de cultura (Figura 4). As placas foram mantidas em estufa por 24 horas a 37°C. As colônias que se desenvolveram foram estriadas, com auxílio de uma alça de inoculação (técnica de esgotamento), em placas contendo meio de cultura sólido, com a fonte lipídica originalmente utilizada. Os micro-organismos foram mantidos novamente em estufa sob as mesmas condições de temperatura e tempo descritos anteriormente.

Tabela 3 - Composição do meio de cultura para espalhamento e esgotamento de micro-organismos

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	1
Extrato de Levedura	1
Fosfato de Potássio KH ₂ PO ₄	0,2
Sulfato de Magnésio MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
Óleo Vegetal / Gordura Animal	1
Ágar	18

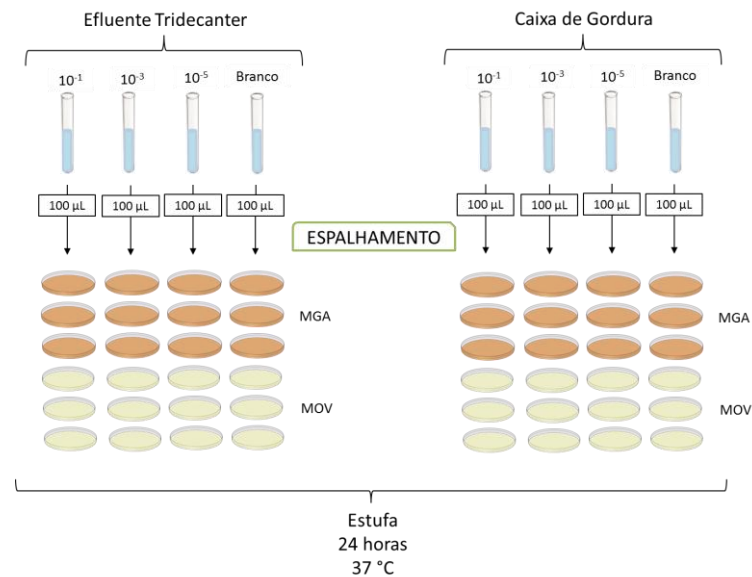


Figura 4 - Representação esquemática da técnica de espalhamento em placa de micro-organismos das amostras de efluente do curtume. MGA: meio de cultura contendo gordura animal; MOV: meio de cultura contendo óleo vegetal

4.2.1.2 Teste de lipase

Após o isolamento, os micro-organismos obtidos foram submetidos a teste de lipase para identificação daquelas colônias capazes de produzir a enzima de interesse. Primeiramente retirou-se uma alçada da colônia e esta foi inoculada em 3,0 mL de meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI), mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. Após o período de enriquecimento, prepararam-se placas de Petri com o meio de cultura Tween 20 Ágar (Tabela 4), esterilizando o Tween 20 separadamente dos demais reagentes, sendo posteriormente adicionado na proporção indicada aos demais reagentes do meio de cultura. Aliquotas de 50 µL do caldo BHI enriquecido, de cada amostra, foram inoculadas na porção central das placas de Petri sem espalhamento, e deixadas secar por 30 minutos no fluxo laminar. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada cepa bacteriana isolada. Posteriormente, as placas foram transferidas para a estufa e incubadas a 37°C por 72 horas. Na sequência, foi verificado se houve a formação de halos esbranquiçados ao redor das colônias, constatando a produção ou não da enzima. Também foi estimado o Índice Enzimático (IE), expresso pela soma entre duas vezes a espessura do halo de degradação do substrato (hD) e a espessura do halo de crescimento da colônia (hC), dividido pela espessura do halo de crescimento (hC).

Tabela 4 - Composição do meio de cultura para realização do teste da lipase

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
Peptona	10
Cloreto de Sódio (NaCl)	5
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	0,1
Tween 20	1% (v/v)
Ágar	18

4.2.1.3 Identificação prévia dos micro-organismos

As colônias que apresentaram resultados positivos no teste da lipase, foram cultivadas em meio CHROMagar™ Orientation, mantidas em estufa por 37°C por 24 horas. Esse meio de cultura possui substratos cromogênicos que fazem com que diferentes espécies apresentem colorações distintas. As mesmas também foram submetidas a coloração de Gram, identificação microscópica de sua morfologia e testes bioquímicos: catalase, citrato de Simmons, tríplice açúcar ferro (TSI) e motilidade (MIL). Esses testes têm por objetivo identificar as características metabólicas dos micro-organismos e facilitar sua identificação.

4.2.1.4 Preparo do inóculo

Com o objetivo de estudar a ação dos micro-organismos na remoção de gordura do efluente, preparou-se um inóculo com os micro-organismos do produto comercial Enzilimp® e outro com as bactérias que apresentaram maior IE. Primeiramente, fez-se ativação das bactérias lipolíticas selecionadas, adicionando-se, em erlenmeyers de 250 mL, uma alçada de colônia em 50 mL de solução nutritiva estéril (Tabela 5). Para o Enzilimp®, preparou-se a solução em água indicada pelo fabricante. Desta solução retirou-se 100 µL e adicionou-se a outro erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de solução nutritiva. Os erlenmeyers foram colocados em agitador-incubador a 150 rpm, a 35°C por 24 horas.

Após o período de ativação, foram adicionados a erlenmeyers de 250 mL, 50 mL de efluente lipídico esterilizado e o sobrenadante ativado a uma proporção de 1% (v/v), sendo mantidos, nas mesmas condições anteriormente descritas, por 12 horas.

Ao final, os inóculos foram preparados adicionando-se, na mesma proporção anterior, o sobrenadante do pré-inóculo em erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de efluente lipídico esterilizado. Os inóculos foram inseridos no agitador-incubador a 150 rpm, a 35 °C por 12 horas.

A concentração de células nos inóculos foi mensurada pelo método de diluição em placa, inoculando 100 µL da diluição 10⁻⁵ em placa de Petri contendo o meio de cultura

MOV. Os diferentes micro-organismos utilizados foram preparados de modo a conter quantidade aproximadas de células viáveis nos inóculos. Após incubação em estufa por 24 horas a 37°C foram contabilizadas o número de unidades formadoras de colônia (UFCs).

Tabela 5 - Composição do meio da solução nutritiva utilizada no preparo do inóculo

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de Levedura	1,0
Fosfato de Potássio KH ₂ PO ₄	0,2
Sulfato de Magnésio MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2
Óleo de soja	1,0

4.2.2 ETAPA 2 – Ensaios preliminares

Os três ensaios preliminares, conduzidos em temperatura igual a 30°C, pH igual a 7 e 150 rpm foram realizados a fim de obter informações sobre o comportamento do sistema em relação ao perfil temporal de atuação das bactérias (primeiro ensaio), da influência de diferentes concentrações de inóculos bacterianos e enzimáticos (segundo ensaio) e do efeito da diluição do efluente e da aeração nas últimas 24 horas de ensaio (terceiro ensaio). Demais informações referentes aos três ensaios encontram-se descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Ensaios preliminares

Ensaio	Inóculo	Concentração do Inóculo	Água residuária	Objetivo	Tempo de ensaio (h)	Frequência amostragem
1	MOV 4 MOV 7 Enzilimp®	1% (v/v)	<i>In natura</i>	Perfil temporal	70	8 h
2	MOV 7 Enzilimp® Enzima LPP	1%, 5% e 10% (v/v) 1%, 3% e 5% (p/v)	<i>In natura</i>	Concentração do inóculo	72	24 h
3	MOV 7 Enzilimp® Enzima LPP	5% (v/v) 1% (p/v)	Diluída (1:10)	Concentração da água residuária e aeração	48 + 24 de aeração	0 h 48 h 72 h

Os inóculo MOV4 e MOV7 de 1%, 5% e 10% (v/v) correspondem à 10, 50 e 100 mL.L⁻¹.
As concentrações de enzima LPP de 1%, 3% e 5% (p/v) corresponde à 10, 30 e 50 g.L⁻¹.

4.2.2.1 Inóculos utilizados

Foram utilizados inóculos microbianos e enzima LPP. O objetivo foi comparar o desempenho dos micro-organismos selecionados a partir do efluente, do produto comercial denominado Enzilimp® e de enzima pancreática. As características são descritas abaixo:

- **Micro-organismos:** Os micro-organismos utilizados nos experimentos foram as cepas MOV4 e MOV7 obtidas a partir de amostras do efluente do curtume, as quais apresentaram maior índice enzimático no teste de lipase, e os presentes no produto comercial Enzilimp[®]. Segundo o fabricante (rótulo), este produto é constituído de farelo de trigo, cloreto de sódio e duas espécies de bactérias: *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, que atuam na degradação de resíduos orgânicos poluentes. O produto é indicado na remoção de matéria orgânica da caixa de gordura de restaurantes e cozinhas industriais, rede de esgoto de residências e em estações de tratamento de esgoto (ETE). A solução inicial foi preparada em água estéril utilizando a concentração indicada pelo fabricante (4 g.L^{-1}).
- **Enzima:** Foi aplicada nos ensaios a lipase extraída de pâncreas de porco (LPP Tipo II), comercializada pela Sigma Aldrich[®]. Essa enzima, segundo o fabricante, contém esteapsina, enzima produzida pelo pâncreas e liberada no duodeno a fim de hidrolisar triglicérides em ácidos graxos e glicerol. O produto comercial também apresenta atividade hidrolítica para proteínas e carboidratos. Segundo informações do fabricante, uma unidade enzimática deste produto é capaz de hidrolisar 1,0 microequivalente de ácidos graxos em 1 hora.

4.2.2.2 Protocolo experimental

Os ensaios 1 e 2 foram conduzidos em erlenmeyer de 250 mL, mantidos em agitador incubador SHAKER SL 222, a 30°C, pH 7 e com rotação de 150 rpm por 70 horas. O ensaio 3 foi preparado em tubos de vidro de 375 mL mantido em agitador incubador sob as mesmas condições anteriores por 48 horas (Figura 5). Após esse período os tubos foram transferidos para banho maria e aerados por 24 horas (Figura 6). As amostras de efluente de curtume utilizadas nos ensaios não foram autoclavadas.



Figura 5 – Agitador incubador: sistema fermentativo

Para a aeração dos ensaios foi construído uma caixa com água aquecida por serpentina, mantendo um sistema de banho maria no qual os tubos permaneciam imersos. Cada ensaio recebeu aeração individual utilizando bombas de aeração conectadas em mangueiras de silicone com difusores porosos em cada uma das ramificações da mangueira (Figura 5).



Figura 6 – Sistema de aeração e banho maria para controle da temperatura

As amostras dos ensaios foram acondicionadas em frascos de polietileno devidamente identificados e armazenados sob refrigeração a 5°C. As análises físico-químicas foram realizadas em duplicata monitorando-se a variação temporal das variáveis dependentes DQOt, DQOs, teor de O&G e IA.

4.2.3 ETAPA3 – Pré-tratamento do efluente com bactéria MOV7 e enzima LPP

Com base nos resultados das etapas anteriores, foram realizados ensaios seguindo-se o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com quatro variáveis independentes, com 6 repetições no ponto central, resultando em 30 ensaios (RODRIGUES E LEMMA, 2009). Os valores de referência das variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 7 e os dados dos 30 ensaios estão apresentados na Tabela 8. Como respostas, foram analisadas a DQOt, a DQOs, o teor de O&G e IA. Foram estimados os efeitos dos parâmetros independentes e, para os estatisticamente significativos ($p < 0,1$), submetidos ao cálculo da ANOVA. A partir dos resultados foram gerados modelos matemáticos e curvas de contorno.

Nesses 30 ensaios, inoculou-se o efluente com concentrações de enzima e bactéria lipolítica determinadas para cada tratamento, obtendo-se em cada tubo de vidro o volume total de efluente e inóculo igual a 300 mL. Os tubos foram armazenados em agitador incubador por 48 horas a 150 rpm, variando temperatura e pH conforme determinado nos tratamentos do DCCR. Posteriormente os tubos foram mantidos em banho maria com aeração por 24 horas. A vazão de ar foi controlada visualmente por meio de pequenos registros individuais em cada frasco. As amostras para análises físico-químicas foram coletadas em 0h, 48h e 72 h de experimento, sendo retiradas alíquotas de 100 mL em cada amostragem. O volume de amostra excedente foi acondicionado em frascos de polietileno devidamente identificados e armazenados sob refrigeração a 5°C.

Tabela 7 - Valores codificados e reais das variáveis independentes utilizadas no planejamento experimental

Variáveis	Níveis					
	-2	-1	0	+1	+2	
Temperatura (°C)	25,0	27,5	30,0	32,5	35,0	
pH	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	
Concentração inóculo	MOV7 (mL.L ⁻¹) (v/v %)	20 (2%)	40 (4%)	60 (6%)	80 (8%)	100 (10%)
	LPP (g.L ⁻¹) (p/v %)	2 (0,2%)	4 (0,4%)	6 (0,6%)	8 (0,8%)	10 (1,0%)
Diluição do efluente (mL.L ⁻¹)	12,5	25,0	37,5	50,0	62,5	

Tabela 8 - Identificação das condições aplicadas em cada um dos ensaios

Ensaio	Temp (°C)	Conc. Inóculo	Diluição Efluente	pH
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-2	0	0	0
18	2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

4.3 Monitoramento físico químico

As análises realizadas durante o monitoramento do sistema encontram-se discriminadas no Quadro 1, seguindo os métodos descritos por AWWA/APHA/WEF (2005).

Quadro 1 - Análises físico-químicas do efluente do curtume

Parâmetro	Método
pH	4500-H
O&G	Suehara et al., (2005).
Índice acidez	Instituto Adolfo Lutz (2008)
Condutividade	2510 A
DQO	5220 D
ST	2540 B

STF	2540 E
STV	2540 E
Nitrogênio total	4500 N _{org} B
Nitrogênio amoniacal	4500 N _{NH3} B

Para a obtenção dos valores de DQOs, filtrou-se a amostra, utilizando bomba de vácuo, com membrana de fibra de vidro, porosidade de 1,2 µm e φ 47mm (Whatman GF/C). A amostra filtrada foi analisada seguindo o mesmo procedimento da DQO total.

O Teor de Óleos e Gorduras (O&G) foi obtido pelo método da extração por hexano, conforme Suehara et al. (2005). Neste método, acidifica-se 15 mL do efluente lipídico com 180 µL de HCl (2N), em tubo Falcon, e adiciona-se a essa mistura 1,5 mL de n-hexano. Após homogeneização, a solução é centrifugada (3000 rpm) durante cinco minutos. A camada de hexano que se forma na porção superior do tubo (Figura 7) é retirada e colocada em recipientes de vidro previamente pesados (P0), secos e frios. Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada ensaio. A porção de hexano extraída do tubo foi levada para evaporação em estufa de secagem a 80 °C por 24 horas. Após a secagem, o substrato restante foi pesado obtendo-se P1. O teor de O&G foi calculado pela Equação 2, sendo P0 o peso do recipiente vazio e P1 o peso do recipiente com o extrato seco.

$$T_{(O\&G)} = (P_1 - P_0) \cdot \frac{1000}{15} \quad \text{Eq.1}$$



Figura 7 - Análise de teor de O&G pelo método de extração por hexano

O índice de acidez (IA) foi obtido adicionando-se uma solução de éter etílico e álcool etílico (1:1 v/v) em 2,0 g do efluente submetido à ação das bactérias lipolíticas. Posteriormente a amostra foi então titulada com solução NaOH (0,1 mol.L⁻¹) utilizando como

indicador a fenolftaleína (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O índice de acidez foi calculado pela Equação 2, e expressa a massa, em miligramas de hidróxido de potássio, necessária para neutralizar um grama da amostra.

$$IA = \frac{V.f.M.28,2}{P} \quad \text{Eq.2}$$

Sendo:

V o volume gasto (mL) de NaOH na titulação, f é o fator de correção da solução de NaOH, M a molaridade da solução de NaOH utilizada e P a massa da amostra (g).

4.4. Análises estatísticas

O *software* STATISTICA 12 foi utilizado para determinar o efeito das variáveis independentes, a análises de variância (ANOVA) e obtenção das curvas de contorno, ao nível de significância de 10% (RODRIGUES E LEMMA, 2009).

4.5. Variáveis calculadas a partir do monitoramento

As variações da DQOt, DQOs, O&G e IA nos períodos de 0h a 48h (fermentação), 48h a 72h (aeração) e global (0h a 72h) foram calculadas pelas equação 3, 4 e 5:

$$VP_{fermentativo} = Vm_{48h} - Vm_{0h} \quad \text{Eq.3}$$

$$VP_{aerado} = Vm_{72h} - Vm_{48h} \quad \text{Eq.4}$$

$$VP_{global} = Vm_{72h} - Vm_{0h} \quad \text{Eq.5}$$

Em que:

VP é a variação do parâmetro e Vm o valor medido em cada período do ensaio.

Fração de DQO solúvel

$$Fração_{DQOs} = \frac{DQOs}{DQOt} \quad \text{Eq.6}$$

Variação percentual

$$V_{\%fermentativo} = \left[\frac{(Vm_{0h} - Vm_{48h})}{Vm_{0h}} \right] \cdot 100 \quad \text{Eq.7}$$

$$V_{\%faerado} = \left[\frac{(Vm_{48h} - Vm_{72h})}{Vm_{48h}} \right] \cdot 100 \quad \text{Eq.8}$$

$$V_{\%global} = \left[\frac{(Vm_{0h} - Vm_{72h})}{Vm_{0h}} \right] \cdot 100 \quad \text{Eq.9}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do efluente

A caracterização da água residuária (Tabela 2) revelou que seu teor de gordura é muito elevado quando comparado com as concentrações de O&G dos efluentes lipídicos típicos presentes na literatura (CAMMAROTA E FREIRE, 2006). O pH apresentou-se levemente ácido, há alta concentração de sal, medida pela condutividade, equivalendo a 3,3g de NaCl.L⁻¹. As peles que chegam ao curtume, em geral, são conservadas com sal (até 500 kg por tonelada de pele *in natura*). A etapa de “bater sal” remove parcialmente o sal em excesso, entretanto ainda permanece grande quantidade no pré-descarne, etapa que origina o efluente.

A presença de sal pode aumentar a tensão superficial da solução, ou seja, a presença do cloreto de sódio dissolvido na água aumenta as interações intermoleculares (maior coesão entre as moléculas). Além disso, conforme descrito por Mendes e Castro (2005), durante a hidrólise de lipídios, o pH na interface lipídio/enzima se torna menor do que no meio líquido, devido aos ácidos graxos de cadeia longa carregados negativamente que atraem íons H⁺. Assim, a presença de NaCl no efluente pode ser benéfica, reduzindo o gradiente de pH na interface, onde o complexo enzima-substrato é formado. Segundo os autores, o acréscimo de 7,0 mM de NaCl em efluente de laticínio com concentração lipídica de 1,5 g.L⁻¹ favoreceu a redução de 42,8% de DQO.

5.2 Etapa 1 - Obtenção de micro-organismos lipolíticos a partir de efluente de curtume

Após a inoculação de amostras do efluente em meios de cultura sólidos, foram obtidas 21 cepas a partir do meio de cultura MGA e 22 cepas do meio de cultura MOV, as quais apresentaram cinco morfologias distintas (Figura 8).

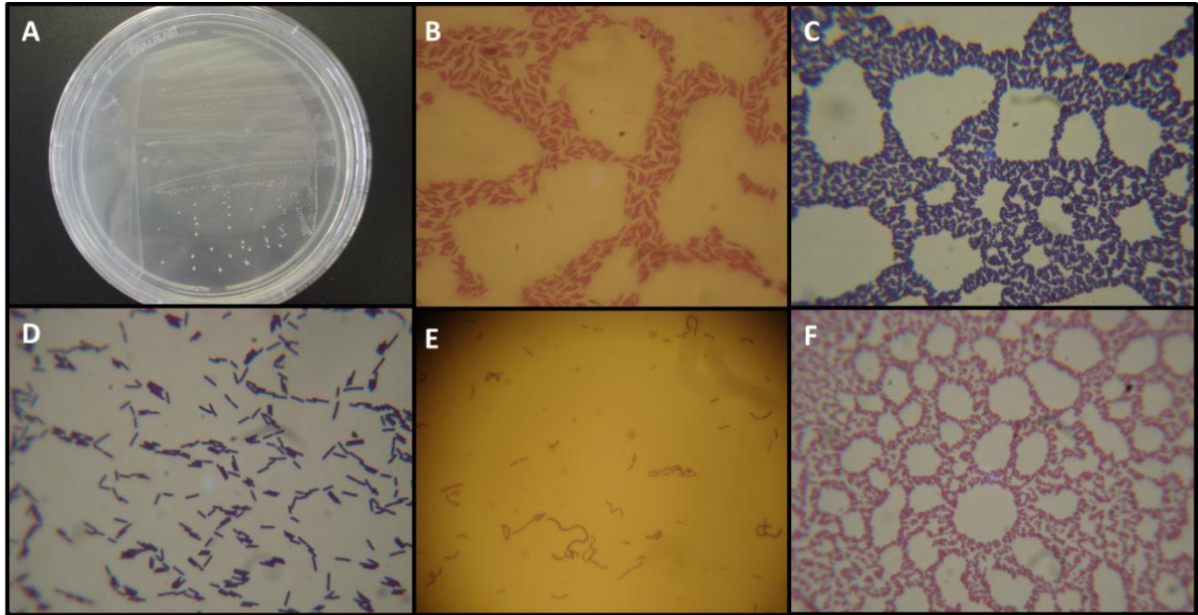


Figura 8 Fotografia (A) Morfologias encontradas nas colônias bacterianas isoladas, (B) bacilo gram negativo, (C) estafilococo gram positivo, (D) bacilo gram positivo, (E) estreptobacilo gram positivo (F) e estafilococo negativo

O teste de produção de lipase foi aplicado nas 43 cepas, obtendo-se resultados positivos, com formação do halo de degradação ao redor da colônia (Figura 9) em 14 (07 isoladas em MGA e outras 07 em MOV).

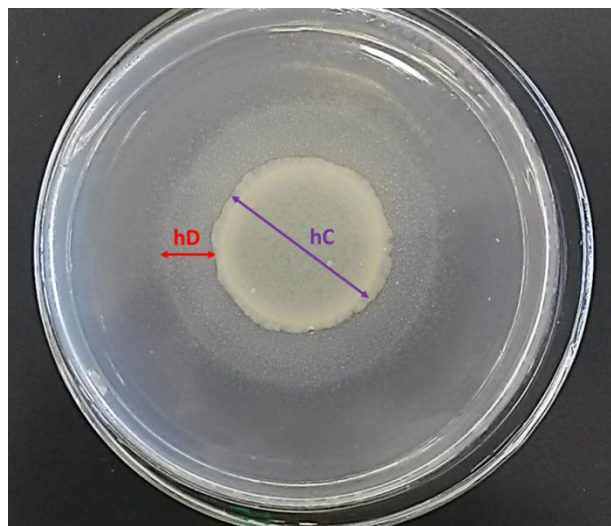


Figura 9 - Colônia bacteriana cultivada em meio Tween 20 ágar para teste da produção de lipase. Halo de crescimento da colônia (hC), halo de degradação da lipase (hD)

A Tabela 9 contém os valores de IE encontrado para cada cepa, sendo a cepa MOV7 a que apresentou maior valor (IE=1,68). Trabalhos que utilizaram a mesma metodologia encontraram índices com valores maiores que os encontrados neste trabalho. Vieira e colaboradores (2006) encontraram bactérias degradadoras de óleo Diesel com IE variando entre 1,4 e 7,0, porém com período de incubação de 96 horas. Nos trabalhos de Rocha et al.

(2013) encontrou-se índices próximos dos descritos neste trabalho para o mesmo período de incubação, variando entre 1,28 e 1,71. Baseado no período em que o teste foi incubado pode-se afirmar que a cepa MOV7 produz quantidade razoável de enzima.

Para confirmação do isolamento, as 14 cepas produtoras de lipase foram cultivadas em meio de cultura CHROMagar™ Orientation e apresentaram três colorações e morfologias distintas: branco leitoso (B), verde claro (V) e azul escuro (A) (Figura 10). As morfologias dessas cepas bacterianas são: estafilococo positivo, estreptobacilo positivo e bacilo negativo, respectivamente. Os resultados dos testes bioquímicos/ estão descritos na Tabela 10.

Tabela 9 - Índice enzimático das colônias bacterianas com resultado positivo para o teste de lipase. Morfologia: Bacilo gram negativo (B -), Estafilococo gram positivo (EC+), Estreptobacilo gram positivo (EB+)

Meio de Cultura	Cepa	hC (mm)	hD (mm)	I.E.	Morf.	Meio de Cultura	Cepa	Hc (mm)	hD (mm)	I.E.	Morf.
MOV	1	27	4,5	1,37	B -	MGA	8	36	6	1,33	EB+
	2	28	8	1,57	EC+		9	30	9	1,6	EC+
	3	32	9	1,56	EC+		10	30	8	1,53	EC+
	4	30	5	1,33	B -		11	28	9	1,64	EC+
	5	34	1	1,06	EB+		12	41	4	1,20	EB+
	6	30	9	1,60	EC+		13	31	4	1,26	B -
	7	29	10	1,68	EC+		14	30	8	1,53	EC+



Figura 10 - Esgotamento em meio de cultura CHROMagar™ Orientation das cepas produtoras de lipase

Tabela 10 - Resultado dos testes bioquímicos de catalase, motilidade (MIL) e tríplex açúcar ferro (TSI)

Morfologia	Catalase	Mil	TSI
Estafilococo positivo	-	-	Capaz de degradar apenas glicose
Estreptobacilo positivo	+	+	Capaz de degradar glicose, sacarose e lactose.
Bacilo negativo	+	+	Capaz de degradar glicose, sacarose e lactose. Com produção de gás.

Dentre os micro-organismos lipolíticos mais frequentemente citados na literatura destacam-se a *Pseudomonas aeruginosa* e espécies do mesmo gênero, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (HABA et al., 2000; MONGKOLTHANARUK E DHARMSTHITI, 2002; GUPTA, GUPTA E RATHI, 2004; EL-BESTAWY, EL-MASRY E EL-ADL, 2005;

CAMMAROTA E FREIRE, 2006; HASAN, SHAH E HAMEED, 2006; SIRISHA, RAJASEKAR E NARASU, 2010; PRASAD E MANJUNATH, 2011; MOBARAK-QAMSARI et al., 2012). Nesses estudos os micro-organismos foram isolados de solos contaminados com óleos e gorduras ou de efluentes industriais.

A morfologia e as características dos três organismos isolados do efluente de curtume se aproximam dessas espécies, podendo representar mesmo gênero. Além disso, a espécie *Bacillus subtilis* encontrada no Enzilimp[®] está descrita na literatura como micro-organismo produtor de lipase utilizado no tratamento de efluente. A espécie *Bacillus licheniformis*, também presente no Enzilimp[®], apresenta baixa atividade enzimática comparada às demais estudadas (HABA et al., 2000; PRASAD E MANJUNATH, 2011).

5.3 Etapa 2 – Ensaio preliminares

Os ensaios preliminares tinham o objetivo de verificar o efeito dos inóculos microbianos isolados (MOV7 e MOV4), comercial (Enzilimp[®]) e enzimático (LPP) na variação da DQOt, DQOs, O&G e IA. Buscou-se investigar a influência do tempo de duração dos ensaios (tempo de ciclo) e os efeitos das concentrações dos inóculos, diluições do efluente, pH e aeração do meio líquido.

5.3.1 Ensaio 1 – Determinação do tempo de duração dos ciclos

Buscou-se definir o período de duração dos ciclos a ser utilizado nos demais ensaios, por meio do monitoramento temporal das variáveis DQOt, O&G e IA. Foi utilizado o efluente coletado da graxaria de curtume contendo DQOt de 38,13 gO₂.L⁻¹ e O&G de 17,14 g.L⁻¹, superiores aos geralmente relatados na literatura que visam a remoção de lipídeos. O inóculo utilizado nos ensaios possuía micro-organismos na faixa de 10⁸ células viáveis.

A Figura 11 exibe os valores de DQOt ao longo do perfil de operação do sistema, podendo-se constatar elevação consistente nas primeiras 6 horas de ciclo.

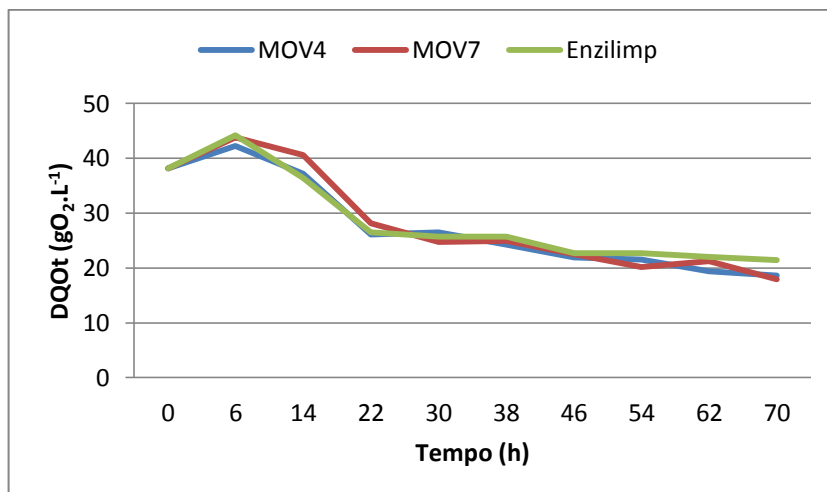


Figura 11 - Variação temporal da DQO total para MOV4, MOV7 e Enzilimp® no primeiro ensaio preliminar

Uma possível explicação, segundo Aquino e colaboradores (2006), é que a análise de DQO, baseada na digestão ácida dos compostos lipídicos, gera valores medidos menores que os teóricos, uma vez que o dicromato de potássio pode não oxidar completamente as moléculas complexas. De acordo com esses autores, a DQO experimental média do óleo de soja ($1,60 \text{ g DQO.g óleo}^{-1}$) foi 53% da DQO teórica do ácido graxo palmítico ($\text{C}_{51}\text{H}_{98}\text{O}_6$) utilizado no teste ($2,97 \text{ gDQO.glipídeo}^{-1}$). No efluente estudado (Tabela 2), obteve-se relação de $2,2 \text{ g DQOt.gO\&G}^{-1}$, valor inferior ao típico teórico para lipídeos. Assim, possivelmente, após sofrer hidrólise pela ação dos micro-organismos, os triacilglicerois são fragmentados em moléculas menores, favorecendo a oxidação pelo dicromato de potássio.

Desta forma, a elevação da DQO nas primeiras 6 horas pode revelar que o valor inicial foi subestimado e não dada pelo aumento da carga de matéria orgânica. De modo geral, a DQOt do sistema reduziu mais substancialmente no período de 6h a 22h e decréscimo linear menos intenso no restante do experimento. Na hidrólise dos triglicerídeos não são esperadas grandes variações de DQO, como as observadas, uma vez que não há alteração do número médio de oxidação do carbono. No trabalho de Mendes e Castro (2005) encontrou-se pouca variação de DQO logo após o período de hidrólise do efluente com lipase pancreática.

A Figura 12 permite observar flutuações do teor de O&G, com redução mais acentuada após 46 horas, na faixa de 77% para os microrganismos isolados (MOV4 e MOV7) e 72% com Enzilimp® indicando que, juntamente com outros constituintes orgânicos, as bactérias podem também consumir os compostos lipídicos. Ressalta-se que o fabricante do produto Enzilimp® indica a sua utilização em águas residuárias com até 1 gL^{-1} de O&G.

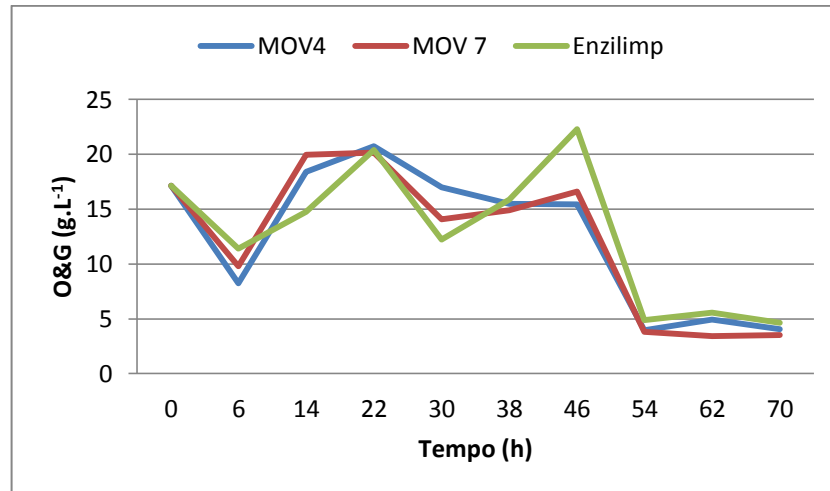


Figura 12 - Variação temporal do teor de óleos e graxas para MOV4, MOV7 e Enzilimp® no primeiro ensaio preliminar

A flutuação de O&G observadas nesse experimento também foi verificada por ROCHA et al., (2013) utilizando a mesma metodologia de determinação.

Ao avaliar IA, observou-se comportamento semelhante entre os inóculos bacterianos (MOV4, MOV7 e o Enzilimp®), havendo redução desse índice ao longo do tempo (Figura 13), o que pode indicar consumo dos produtos intermediários da hidrólise pelas bactérias. Trabalhos como os de Valente et al. (2010) e Alexandre et al. (2011) reportam baixa variação de ácidos graxos livres no processo de hidrólise, uma vez que sua geração é acompanhada do consumo pelos micro-organismos presentes no meio.

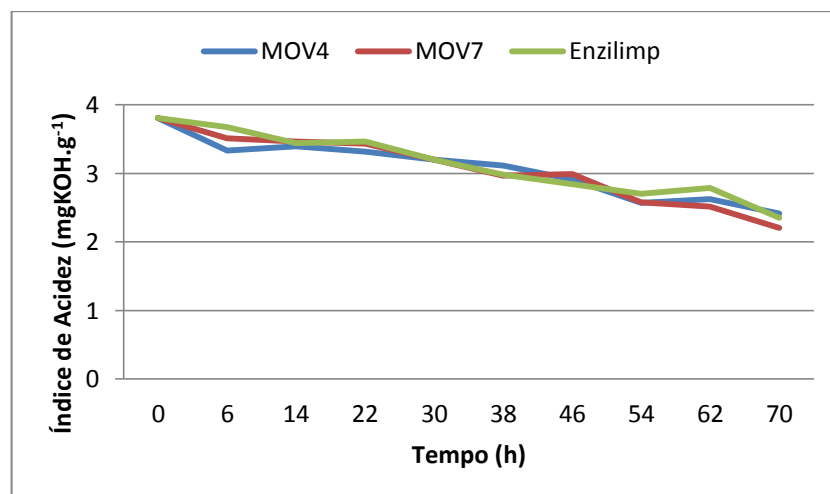


Figura 13 - Variação temporal do índice de acidez para MOV4, MOV7 e Enzilimp® no primeiro ensaio preliminar

Pode-se constatar que os organismos inoculados apresentaram comportamento semelhante quanto a redução de DQOt, O&G e IA. Nos experimentos posteriores, foi

selecionada, como inóculo, a cepa MOV7, por apresentar Índice Enzimático ligeiramente superior. Pelos resultados obtidos, foi estabelecido o tempo de ciclo em 72 horas nos testes posteriores. Períodos superiores podem ser inviáveis para aplicação industrial, pelo tamanho das unidades de tratamento e possível baixa competitividade com sistemas físico-químicos.

5.3.2 Ensaio 2 - Influência da concentração dos inóculos MOV7, Enzilimp[®] e enzima LPP

O objetivo deste ensaio foi investigar a influência de diferentes concentrações dos inóculos (MOV7, Enzilimp[®] e enzima LPP) no desempenho do sistema. Foi mantida a temperatura de 30°C, pH 7 e agitação de 150 rpm.

Observa-se nas Figuras 14 e 15 que a DQOt e DQOs apresentaram elevação dos valores nas primeiras 24 horas. Este comportamento reforça a hipótese que o dicromato de potássio empregado na análise da DQO oxidou parcialmente a matéria orgânica presente na água residuária. As reduções nos valores após este período podem estar relacionadas ao consumo pelos microrganismos presentes no inóculo e/ou no efluente, já que o meio não foi previamente esterilizado. Observa-se que a porcentagem de redução da DQOt foi menor que a encontrada anteriormente (Figura 11), podendo-se inferir, pelo maior número de experimentos realizados neste ensaio, que os resultados de DQOt no primeiro ensaio podem ter sido superestimados.

Com relação à aplicação de enzima LPP, em geral, são relatadas na literatura adições de até 0,5% (p/v) em concentrações de O&G inferiores a 4,7 g.L⁻¹ (MENDES E CASTRO, 2005; DORS, 2013; MENDES, PEREIRA E CASTRO, 2006). Nesta pesquisa, com concentração inicial de O&G na faixa de 17 g.L⁻¹, optou-se por inocular quantidades maiores de 1%, 3% e 5% (p/v). Como consequência, verificou-se que os constituintes da enzima LPP contribuíram para a elevação dos valores iniciais de DQO, principalmente da DQOs (Figuras 16 e 17). Mendes, Pereira e Castro (2006) observaram diferenças na concentração de ácidos graxos livres (mM) no efluente bruto (2,70) e no efluente hidrolisado (54,36). O aumento de ácidos hidrolizados no tratamento com enzima LPP pode favorecer a leitura dos compostos pela digestão do dicromato de potássio na metodologia da DQO.

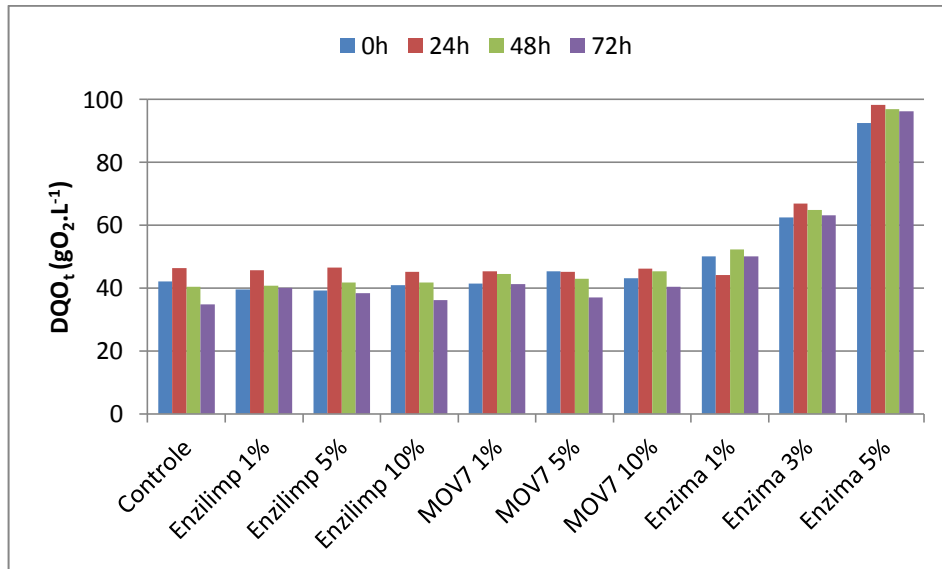


Figura 14 - Valores da DQO total em função do tempo de ensaio e da concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar

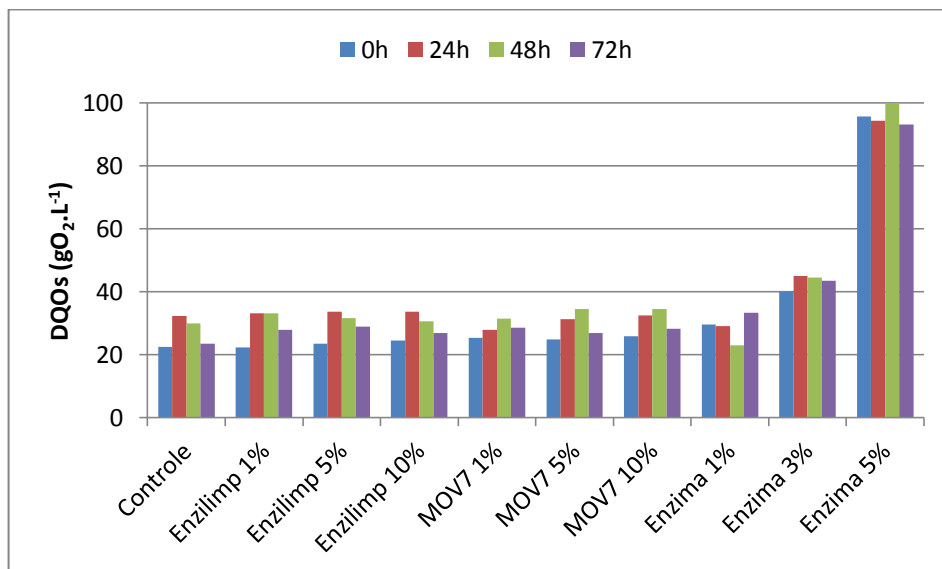


Figura 15 - Valores da DQO solúvel em função do tempo de ensaio e da concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar

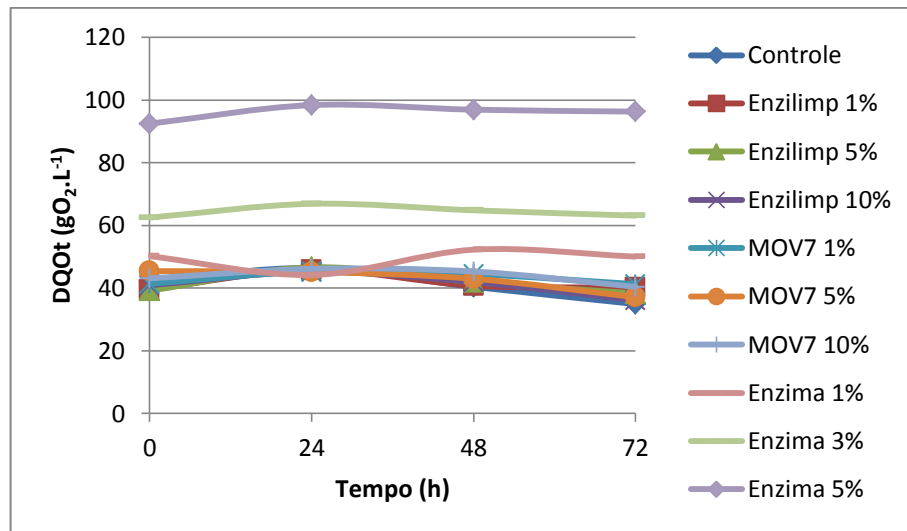


Figura 16 - Variação temporal da DQO total em função do tipo e da concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar

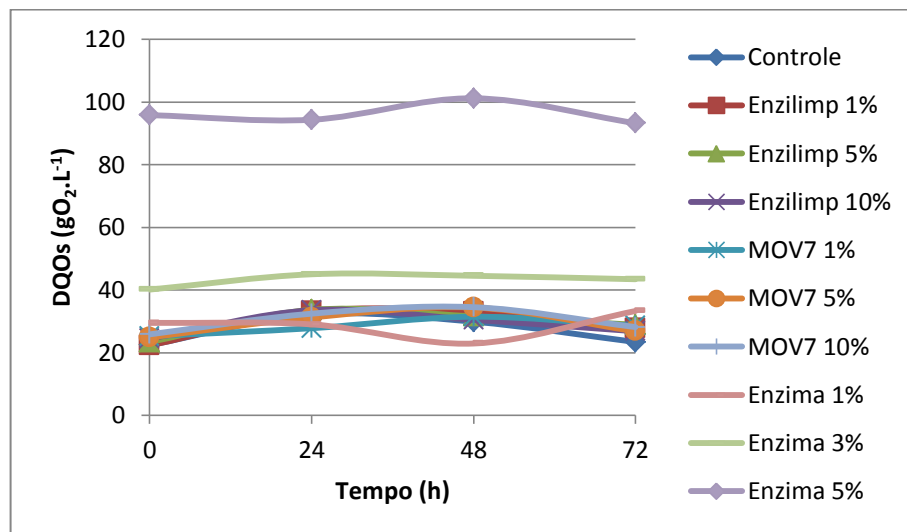


Figura 17 - Variação temporal da DQO solúvel em função do tipo e da concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar

A avaliação do potencial dos inóculos apenas pelas reduções de DQOt e DQOs pode não refletir as alterações ocorridas no meio, pois o processo de fermentação não deveria alterar o estado de oxidação dos carbonos. Assim, adicionalmente, a estimativa das frações solubilizadas ao longo dos experimentos, dada pela relação entre a DQOs e a DQOt pode indicar mudanças na estrutura da matéria orgânica. A Figura 18 exhibe o comportamento da fração de DQOs, podendo-se verificar que, em todos os experimentos com inóculos bacterianos ocorreu aumento da solubilização. Os melhores resultados foram obtidos pelos inóculos Enzilimp (1%) e MOV7 (5%), com valores iniciais de 0,55 e máximos de 0,80, em 48 h de experimento e pequeno consumo das substâncias solubilizadas após este período.

Nos experimentos com enzima LPP, este fenômeno não é evidenciado, uma vez que a

DQO adicionada pelos seus constituintes é prioritariamente de natureza solúvel, conforme já discutido.

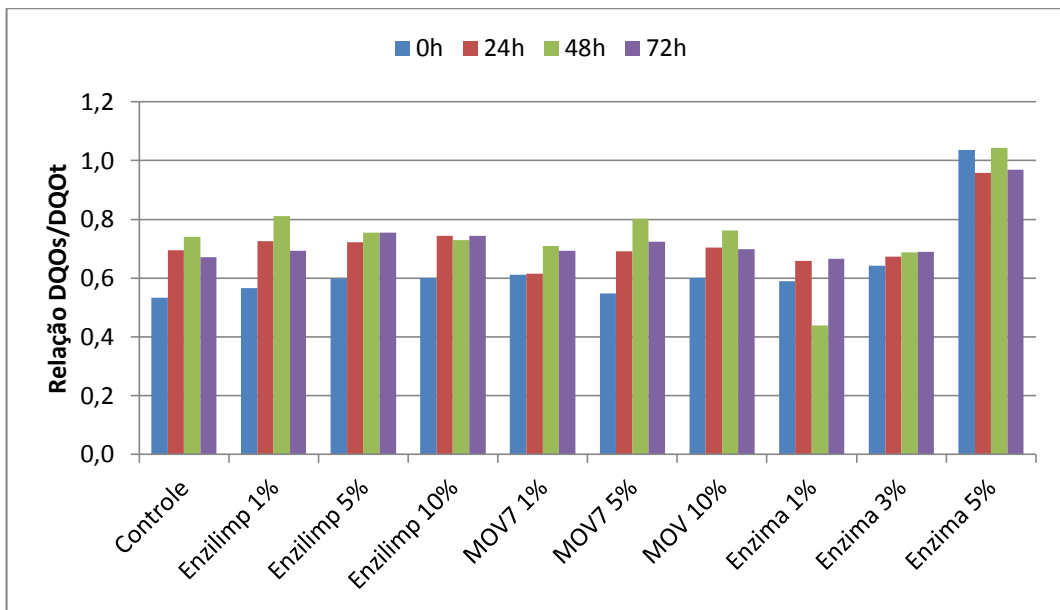


Figura 18 - Valores da relação de DQOs/DQOt em função do tempo e do tipo e concentração dos inóculos no segundo ensaio preliminar

As Figuras 19 e 20 permitem observar flutuações, ao longo do tempo, do teor de óleos e gorduras em todos os testes, repetindo a tendência observada no ensaio 1. Este fato pode estar relacionado com a baixa reprodutibilidade dos resultados pela metodologia utilizada.

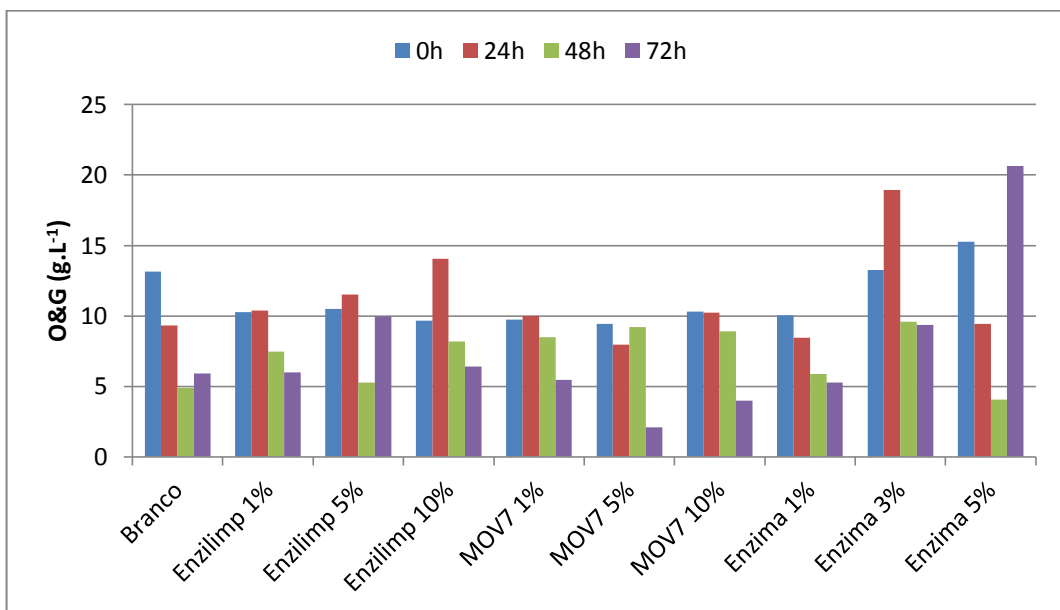


Figura 19 - Variação do teor de O&G dos testes com diferentes concentrações de inóculos no segundo ensaio preliminar

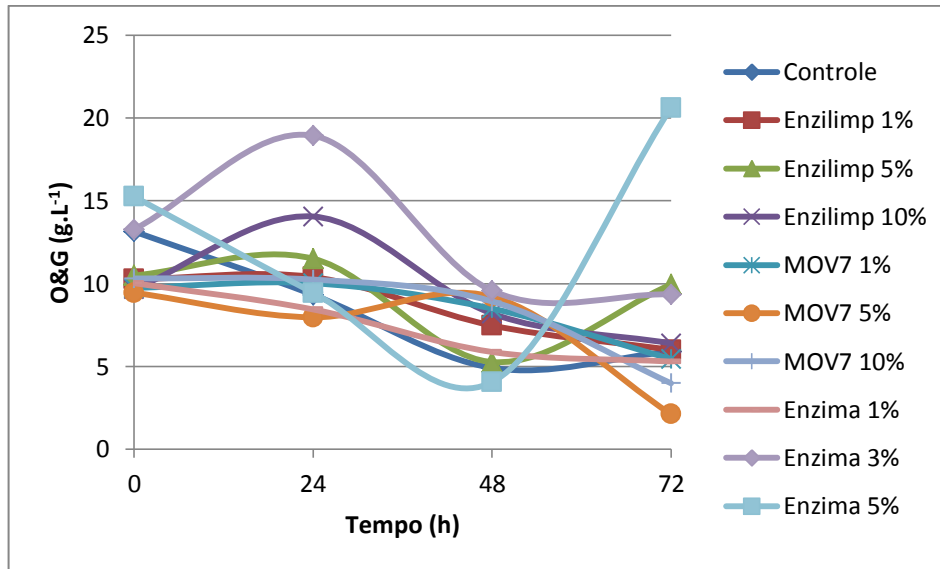


Figura 20 - Variação temporal do teor de O&G dos testes com diferentes concentrações de inóculos no segundo ensaio preliminar

Apesar de não ser possível inferência estatística, observa-se numericamente maior eficiência de remoção de óleo e gordura, em torno de 50% após 72h, com Enzilimp[®] a 1%, MOV7 a 5% e enzima LPP a 1%. De modo geral constata-se a tendência de redução da concentração de gordura do efluente nos testes. No trabalho de Rocha et al. (2013) foram obtidas eficiências de remoção de 80%, após 48 horas, em sistema fermentativo inoculado com bactérias isoladas a partir da água de lavagem de biodiesel (O&G inicial de 6,7 g.L⁻¹).

Mendes e Castro (2005) relatam que a utilização de LPP apresenta melhores resultados no pré-tratamento de efluentes ricos em gordura animal, pois essas lipases são mais eficientes na hidrólise de triacilgliceróis contendo ácidos graxos com mais de 12 átomos de carbono, ao contrário de lipases microbianas, como, por exemplo, de *Rhizomucor miehei*, que possui maior especificidade por triacilgliceróis contendo ácidos graxos com menos de 12 átomos de carbono.

A quantidade excessiva de gordura no efluente do curtume pode ser fator limitante na eficiência de conversão e remoção lipídica. O trabalho de Jung, Cammarota e Freire (2002) demonstrou redução da eficiência do tratamento biológico do efluente conforme aumentava a concentração de lipídios, apresentando eficiência de remoção de DQO nula quando a concentração de óleos e gorduras aplicada foi igual ou superior a 800 mg.L⁻¹. Além disso, a ativação da lipase depende da formação de uma interface lipídeo/água e da adsorção da enzima nessa interface. Com isso o trabalho de Rooney e Weatherley *apud* Mendes et al. (2005) revelaram que quanto menor a razão óleo/água maior será a extensão da hidrólise. O excesso de óleos e gorduras, em especial ácidos graxos de cadeia longa, também poderia gerar

efeitos inibidores no crescimento dos micro-organismos anaeróbios e na produção de enzima, desestabilizando o sistema de pré-tratamento (VALENTE et al., 2010).

O comportamento do índice de acidez revelado nas Figuras 21 e 22, aponta que as diferentes concentrações dos inóculos bacterianos (MOV 7 e Enzilimp[®]) apresentaram variação semelhantes do IA, reduzindo o seu valor ao longo do tempo em cerca de 50%, confirmando a tendência observada no ensaio 1.

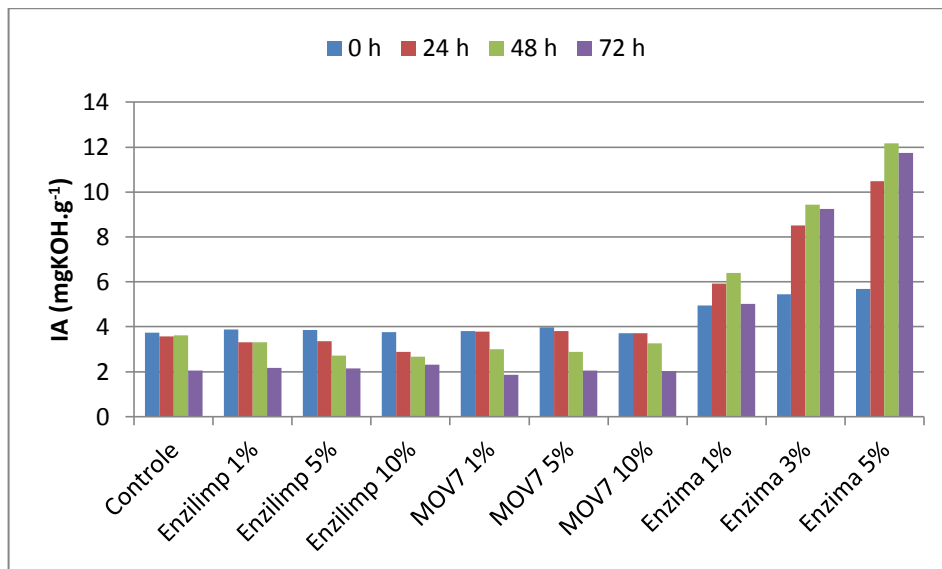


Figura 21 - Variação do Índice de Acidez dos testes com diferentes concentrações de inóculos no segundo ensaio preliminar

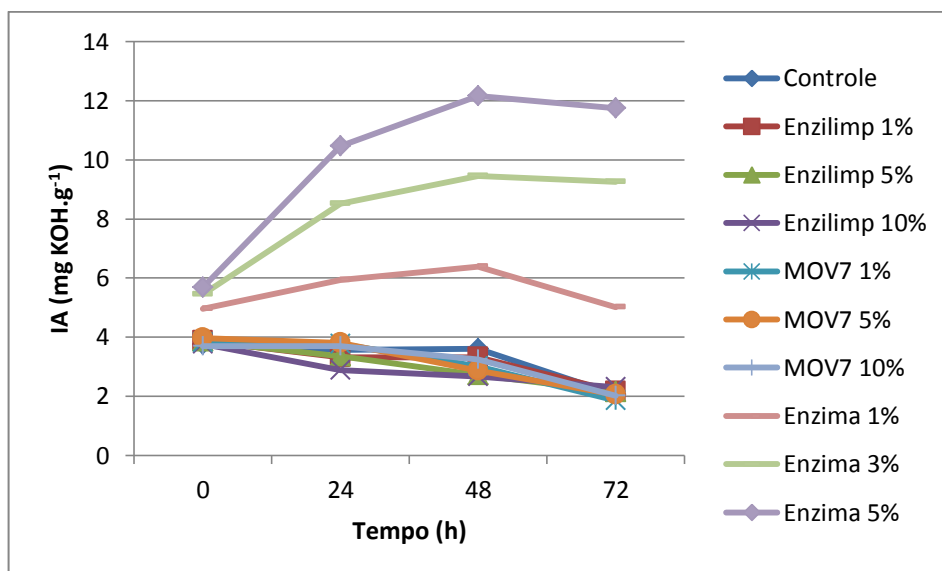


Figura 22 - Variação temporal do Índice de Acidez dos testes com diferentes concentrações de inóculos no segundo ensaio preliminar

Porém, o aumento da concentração de enzima LPP resultou em incremento do IA já no início do experimento (t=0h), persistindo até 48 h, seguido de redução no tempo restante.

Possivelmente, tal fato está relacionado com a degradação dos compostos lipídicos pelas enzimas LPP, que hidrolisam os triacilgliceróis mais rapidamente comparados às lipases bacterianas, por estarem mais facilmente disponíveis no meio. Por se tratar de um processo dinâmico de geração e consumo, é provável que a velocidade de formação de ácidos foi inferior a de utilização nos inóculos microbianos, enquanto que para a enzima LPP, observa-se comportamento oposto, até 48h dos experimentos.

Valente e colaboradores (2010) estudaram a produção de ácidos livres durante a hidrólise das gorduras presentes no efluente da indústria de pescado ($1500 \text{ mg O\&G.L}^{-1}$, 30°C) com diferentes teores de preparados enzimáticos sólidos (PES 0,2, 0,5 e 1,0% m/v). Observaram pequena diferença entre os ácidos livres produzidos no experimento controle ($10 \mu\text{mol.mL}^{-1}$, sem adição de PES) e naqueles com efluente contendo a enzima LPP ($11 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ com 1% de PES). Segundo os autores, os baixos valores de produção de ácidos livres no meio reacional se devem ao fato de haver produção e consumo simultâneos. Os microrganismos, presentes no próprio efluente utilizam os ácidos graxos liberados na hidrólise como substrato, reduzindo sua concentração no meio.

Neste segundo ensaio, o experimento controle, conduzido apenas com efluente não esterilizado, apresentou reduções de DQOt, O&G e IA semelhantes ou, em alguns casos, maior que os testes inoculados com bactérias lipolíticas. O fato de existirem naturalmente micro-organismos adaptados ao ambiente, que não foram extraídos e cultivados em meios de cultura, pode favorecer o consumo da matéria orgânica. Ribeiro e colaboradores (2005) utilizaram sistema de lodo ativado, com micro-organismos adaptados, e obtiveram porcentagens de redução de DQO próximos entre o controle (78%) contra 87% nos testes pré-hidrolizados. Pode-se inferir que, nas condições experimentais testadas, com valores elevados de DQOt, DQOs e O&G, o aumento da concentração de inóculos microbianos, na faixa de 1% a 10%, não demonstrou ganhos substanciais em relação ao experimento controle. Foram observadas reduções de DQOt inferiores a 20% e O&G e IA próximos de 50%. Observou-se a solubilização dos constituintes do meio, com elevação da DQOs para até 80% nos inóculos microbianos e controle, com pouco efeito para os testes inoculados com enzima LPP, uma vez que o efeito da solubilização se confunde com o incremento do material dissolvido constituinte da enzima.

5.3.3 Ensaio 3 Influência da diluição do efluente e da aeração

Neste ensaio, investigou-se o efeito da redução da concentração do efluente, por meio da diluição 1:10 (v/v). Além disso, buscou-se favorecer o metabolismo aeróbio, pela insuflação de ar, visando avaliar a biodegradabilidade do meio pré-hidrolisado. Para tal, foram adicionados como inóculos Enzilimp[®](5%v/v), MOV7(5%v/v) e enzima LPP (1%p/v) e os experimentos conduzidos por 48 h (ambiente anaeróbio), seguidos de 24 h em ambiente aeróbio.

Como pode ser observado na Figura 23, os valores de DQOt tendem a diminuir de forma mais acentuada nas primeiras 48h e mantem-se estáveis durante o período de aeração, nos inóculos microbianos.

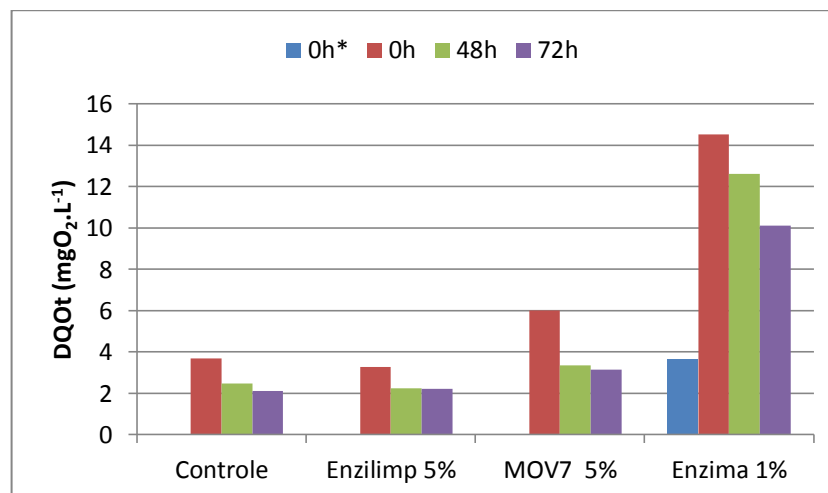


Figura 23 – Valores de DQO total em função do inóculo e do tempo de experimento no terceiro ensaio preliminar contendo efluente de curtume diluído

O período 0h* indica a DQOt momentos antes da adição da enzima LPP

Uma possível explicação para este comportamento é que os micro-organismos presentes não estão suficientemente adaptados ao metabolismo aeróbio. Pesquisas realizadas por Fadile e colaboradores (2011) indicam que a inoculação de biomassa adaptada levou a remoções de DQO de 84,3%, contra 51,9% para micro-organismos sem adaptação, após 6 dias de ensaio. Foi utilizada água residuária sintética esterilizada (DQO 114 gL⁻¹) e adicionado 10% (v/v) dos inóculos.

Estudos citados por Chipasa e Medrzycka (2006) indicam que, em sistemas de lodos ativados tratando lipídios emulsão, não houve inibição pelo substrato nas taxas de aplicação variando entre 0,04 a 0,78 g de lipídios por grama de sólidos em suspensão no tanque de aeração. Também não foi observada redução na velocidade de consumo de

oxigênio. Possivelmente, os lipídios interferem no desempenho do sistema por outros fatores, e não pela inibição das bactérias heterotróficas num sistema de lodos ativados. Uma possível explicação é a adaptação e variedade de micro-organismos presentes na água residuária.

No caso da enzima LPP, os resultados foram influenciados pela composição do inóculo, o qual conferiu elevações da DQOt e DQOs. A Figura 24 permite observar redução da DQOs no ensaio controle e inoculado com enzima LPP, enquanto que nos inóculos microbianos a tendência é permanecer inalterado com discreta alta.

Tomando-se por base os valores medidos de DQO das amostras do efluente coletadas momentos antes da inoculação da enzima (0h*), pode-se estimar acréscimos na ordem de 1,10 gDQOt e 0,66 g DQOs por g de enzima (Figuras 23 e 24).

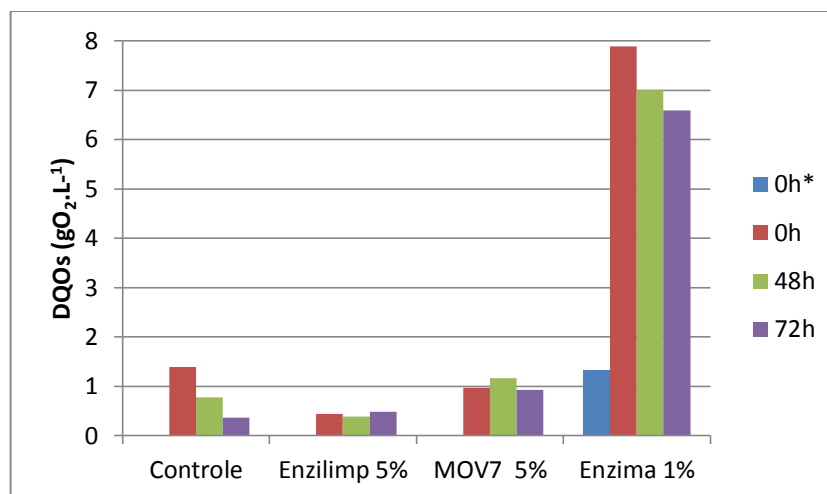


Figura 24 - Valores de DQO solúvel em função do inóculo e do tempo de experimento no terceiro ensaio preliminar contendo efluente de curtume diluído
O período 0h* indica a DQOt momentos antes da adição da enzima LPP

O efeito da diluição do efluente na variação percentual das concentrações de DQOt e DQOs, pode ser visualizado na Tabela 11.

Tabela 11 - Variação percentual (V%) da DQOt e DQOs, Comparação dos ensaios conduzidos com efluente *in natura* (segundo ensaio preliminar) e aqueles conduzidos com efluente diluído (terceiro ensaio preliminar)

Água Residuária	Inóculo	DQOt			DQOs		
		Fermentação 0-48h	Aeração 48-72h	Global 0-72h	Fermentação 0-48h	Aeração 48-72h	Global 0-72h
Diluída	Controle	33,1	13,9	42,4	43,9	53,2	73,7
	Enzilimp 5%	31,4	1,1	32,1	11,1	-25,1	-11,1
	MOV7 5%	44,3	5,8	47,6	-20,0	20,8	5,0
	LPP 1%	13,1	19,9	30,4	11,1	5,9	16,4
<i>In natura</i>	Controle	4,1		17,1	-33,2		-4,3
	Enzilimp 5%	-6,8		2,2	-34,9		-23,4
	MOV7 5%	5,4		18,3	-38,2		-7,8
	LPP 1%	-4,1		0,2	22,3		-12,8

Para a água residuária diluída, observa-se que a remoção global da DQOt variou na faixa de 30,4% (enzima LPP) a 47,6% (MOV7), com maior fração consumida na fase fermentativa e pouco efeito da aeração para o inóculo bacteriano, enquanto que para a bruta (discutida no item 5.3.2) as reduções globais foram inferiores a 18,3%. Pode-se inferir que a diluição do efluente favoreceu o consumo da DQOt, principalmente nas primeiras 48h de experimento em condições anaeróbias.

Já os valores de DQOs indicam tendência de aumento da solubilização da matéria orgânica no efluente *in natura* e predominância do consumo para a água residuária diluída. Este resultado pode indicar que a diluição do efluente, de maneira geral, facilitou o consumo de DQOs com os microrganismos metabolizando o substrato. É possível que, no efluente *in natura*, a velocidade de solubilização seja maior que a de consumo dos substratos pelos micro-organismos presentes, resultando em pequenas variações da DQOt e aumento da DQOs.

Tratamentos anaeróbios de efluente lipídico pré-hidrolizado, que continham DQO inicial entre 1 e 6 gO₂.L⁻¹ atingiram eficiência de remoção de 85 a 95%, com tempos de detenção variando de 20 a 100 dias (VALENTE et al., 2010; ALEXANDRE et al., 2011). Já sistemas de tratamento aeróbio, como lodo ativado, com biomassa aclimatada, atingiram eficiência de redução de DQO maior que 80% com um tempo de detenção hidráulica igual à 20h (RIBEIRO et al, 2005).

Observa-se na Figura 25 que a redução do teor de O&G nas primeiras 48 horas foi maior no experimento controle (79%) e nos testes com inóculos microbianos, com 59% e 57% para MOV7 e Enzilimp, respectivamente. A aeração do sistema favoreceu a remoção de O&G no teste com enzima LPP, aumentando de 3% nas primeiras 48h para 50% nas últimas 24 horas. Estes resultados seguem tendência apresentada para DQOt (Figura 23 e Tabela 11), podendo-se inferir que o consumo da matéria orgânica proveniente dos compostos lipídicos, medidos como O&G. A eficiência global de remoção de O&G pelos micro-organismos foi maior que a apresentada pela enzima LPP (Figura 26).

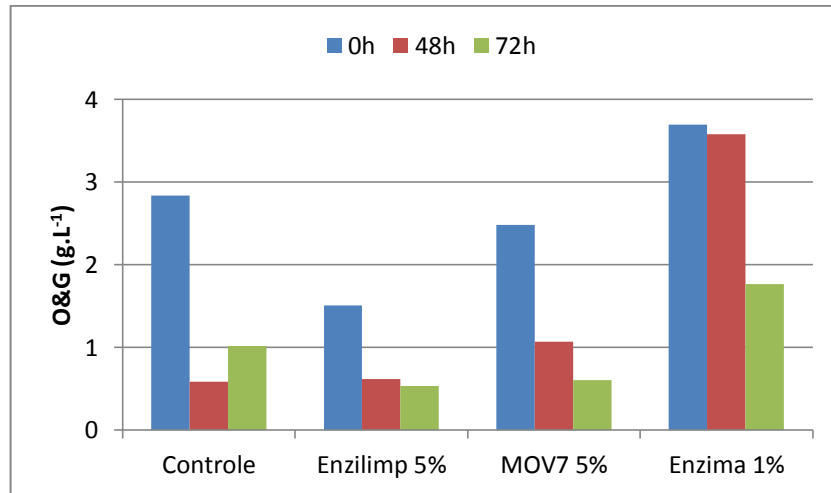


Figura 25 – Variação de O&G no terceiro ensaio preliminar contendo efluente de curtume diluído

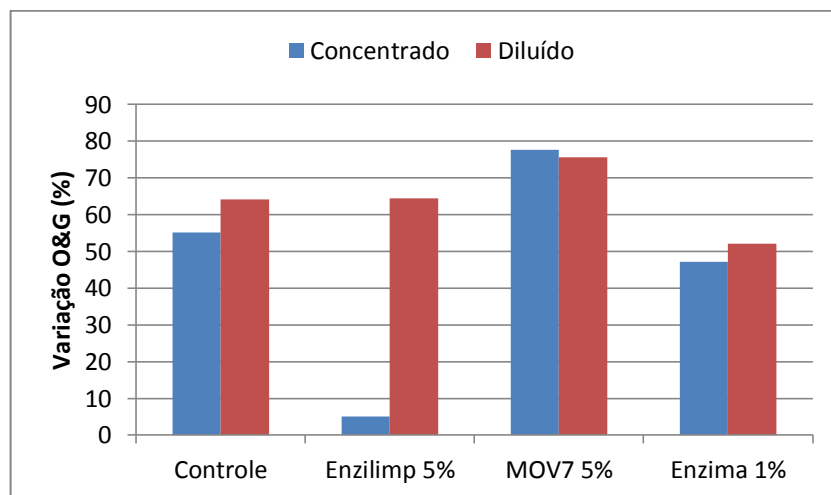


Figura 26 - Variação global (0h-72h) do teor de O&G quando utilizado efluente *in natura* (segundo ensaio preliminar) e diluído (terceiro ensaio preliminar)

O índice de acidez nas primeiras 48 horas manteve o padrão dos resultados verificados nos ensaios 1 e 2, com redução para inóculo bacteriano e aumento para o enzimático. No período aerado observou-se elevação da acidez, possivelmente pelo acúmulo de produtos intermediários não consumidos por micro-organismos aeróbios ou facultativos (Figura 27 e Tabela12). Pode-se inferir que a aeração inibiu a ação de micro-organismos anaeróbios, e pouco favoreceu o metabolismo aeróbio/facultativo presentes, resultando em menores conversões de DQOt, DQOs e O&G e consequente elevação de IA.

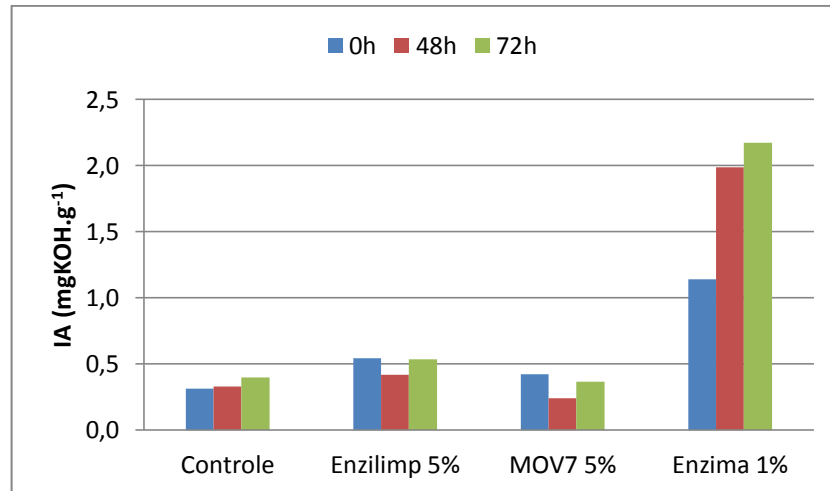


Figura 27 - Variação do índice de acidez no terceiro ensaio preliminar contendo efluente de curtume diluído

Tabela 12 - Variação percentual (V%) do IA. Comparação dos ensaios conduzidos com efluente in natura (segundo ensaio preliminar) e aqueles conduzidos com efluente diluído (terceiro ensaio preliminar)

Inóculo	Concentrada			Diluída		
	Fermentação		Global	Aeração		Global
	0-48h	48-72h		0-48h	48-72h	
Controle	3,7	43,2	45,3	-7,8	-17,7	-26,9
Enzilimp	29,5	21,3	44,6	22,9	-27,5	1,6
MOV7 5%	27,7	28,3	48,1	42,8	-52,0	13,1
LPP 1%	-28,9	21,5	-1,2	-73,9	-9,4	-90,2

Embora micro-organismos heterotróficos aplicados ao tratamento de efluentes apresentem altas taxas de crescimento celular (METCALF & EDDY, 2005; HENZE, 1997), pode ser requerido um tempo de adaptação para o desenvolvimento da biomassa.

Wakelin e Forster (1997) investigaram a remoção de lipídios das águas residuárias provenientes de restaurantes empregando culturas puras, culturas mistas e lodo ativado aclimatado e não aclimatado. Nos experimentos com micro-organismos não aclimatados, observaram um período de adaptação ao meio (fase lag) de um dia. Para o teor inicial de lipídios de 8000 mg.L⁻¹, verificaram eficiências de remoção de 60 a 65% nas culturas puras, 73% nas culturas mistas e acima de 90% para lodo ativado aclimatado, após 7 ou 8 dias de testes. Segundo os autores, a ausência da fase lag resultou num rápido crescimento dos micro-organismos no meio de cultura e as mais elevadas eficiências de remoção de lipídios.

Jeganathan, Bassi e Nakhla (2006) compararam o efeito da autoclavagem do meio na hidrólise de lipídios inoculados com enzima (lipase) imobilizada. Os experimentos foram conduzidos por cinco dias. Os autores observaram aumentos da DQOs (3000 mgO₂.L⁻¹ para até 6000 mgO₂.L⁻¹) e ácidos graxos voláteis de 700 mg.L⁻¹ para 1400 mg.L⁻¹ nos experimentos com efluente autoclavado e valores praticamente constantes para DQOs e

pequeno decréscimo de AGV, tanto no experimento controle quanto nos que receberam enzima imobilizada, para efluente sem esterilização. A autoclavagem do meio favoreceu a remoção de O&G, após 3 dias, com 55% contra 45% do efluente *in natura*.

Pode-se inferir que, no período fermentativo, de maneira geral, a diluição do efluente favoreceu a redução da DQOt, DQOs, O&G e IA nos inóculos bacterianos e teve pouco efeito no período aerado, possivelmente pelo pouco tempo de adaptação dos micro-organismos.

As substâncias constituintes da enzima LPP modificaram as características iniciais dos efluentes *in natura* e diluído, interferindo na avaliação dos resultados.

5.4 Etapa 3 - Efeitos do pH, temperatura, concentração de inóculo e diluição do efluente no pré-tratamento do efluente de curtume

O pré-tratamento do efluente de curtume foi realizado utilizando o planejamento estatístico Delineamento Composto Central Rotacional com 4 (quatro) variáveis independentes: temperatura (x_1), concentração de inóculo (x_2), diluição do efluente (x_3) e pH (x_4). As variáveis respostas foram as variações das concentrações de DQOt, DQOs, O&G e IA, obtidas para os meios inoculados com MOV7 e enzima LPP, nos períodos fermentativo (0-48h), aerado (48-72h de ciclo) e global (0-72h), estimadas pelas equações 3, 4 e 5, respectivamente.

No Apêndice A encontram-se as tabelas com as variações das concentrações de DQOt e DQOs e nos Apêndice B os valores para O&G e IA.

Os coeficientes de regressão obtidos, ao nível de confiança de 90%, para DQOt e DQOs, são mostrados no Apêndice C (período de fermentação), Apêndice D (período de aeração) e Apêndice E, o desempenho global do sistema, entre 0h e 72h.

Para as variáveis O&G e IA, os coeficientes de regressão, ao nível de confiança de 90%, são apresentados nos Apêndices F (fermentação), G (aeração) e H (global).

O Apêndice I sumariza os resultados de análise de variância (ANOVA) e o Apêndice J, os coeficientes de regressão dos modelos quadráticos codificados e reparametrizados que representam as variações das concentrações das variáveis respostas. Também são apresentados os coeficientes de determinação (R^2) e $F_{calculados}$ e $F_{tabelados}$.

5.4.1 Demanda Química de Oxigênio

A Figura 28 mostra os valores das concentrações iniciais de DQOt e DQOs e nas Figuras 29 e 30, as variáveis resposta para os inóculos MOV7 e enzima LPP, respectivamente. A Figura 28 permite observar oscilações das concentrações iniciais de DQO, relacionadas com os valores de inóculos adicionados, principalmente da enzima LPP. Esse efeito se mostra mais pronunciado comparando-se os ensaios 19 e 20, conduzidos nos pontos axiais (-2 e +2), o que permite estimar incrementos de aproximadamente 1,10 g DQOt e 0,93 g DQOs por grama de enzima adicionada. Estes valores confirmam os verificados para DQOt no terceiro ensaio preliminar, e são superiores para DQOs, provavelmente pela diferença das condições experimentais (diluição do efluente $37,5 \text{ mL.L}^{-1}$ e 100 mL.L^{-1} no terceiro ensaio preliminar). Desta forma, as frações iniciais de solubilização, estimadas pelas relações DQOs/DQOt dos valores medidos nos pontos centrais (ensaios 25 a 30) foram de 0,54 e 0,76 para o efluente contendo MOV7 e enzima LPP, respectivamente. Esta constatação pode ter interferido diretamente no resultados dos ensaios do DCCR, já que a variável concentração do inóculo influenciou a condição inicial dos experimentos.

O comportamento das variações de DQOt mostrados na Figura 29, com MOV7, indicam que o período fermentativo, de maneira geral, foi influenciado pelas condições operacionais e oscilação nos primeiros ensaios do período aerado.

Para a enzima LPP (Figura 30) observa-se tendência de remoção em praticamente todos os ensaios, com valores mais elevados durante o período aerado (48h-72h), e influência da DQO adicionada no inóculo. Entretanto, observa-se também, nas Figuras 29 e 30 que as variáveis respostas nos pontos centrais apresentaram oscilação, inferindo-se que outros fatores influenciaram os resultados, como variação interna de pH, variação da biomassa ou capacidade do inóculo em manter a mesma atividade metabólica ao longo do tempo, por exemplo.

Com base na análise estatística (Apêndice J) os fatores que influenciaram a variação global da DQOt nos experimentos inoculados com MOV7, foram a temperatura, a concentração de inóculo e o pH, e modelo matemático foi obtido com $R^2=0,62$ e $F_{\text{calculado}}=7,2$. Tal fato fica evidenciado nas curvas de contorno (Figuras 31 e 32), geradas a partir dos coeficientes de regressão reparametrizados, em que as maiores reduções da DQOt foram obtidas em concentrações mais elevadas de inóculo e valores intermediários de pH (8,0) e temperatura ($32,0^\circ\text{C}$). Possivelmente, os valores dos pontos centrais estudados de pH e temperatura são os que favorecem o desempenho das enzimas microbianas e dos micro-organismos consumidores.

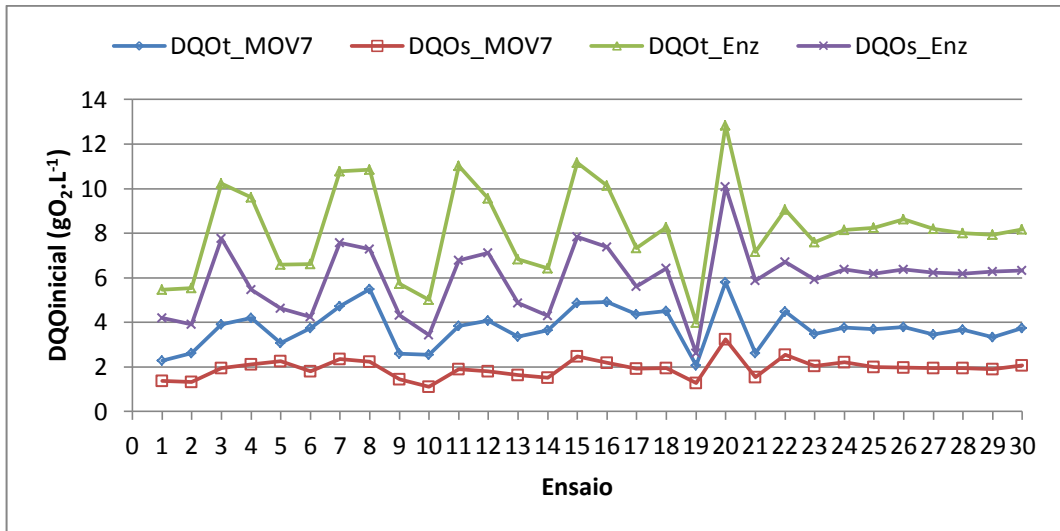


Figura 28 - Valores iniciais de DQOt e DQOs nos ensaios de DCCR inoculados com MOV7 e Enzima LPP

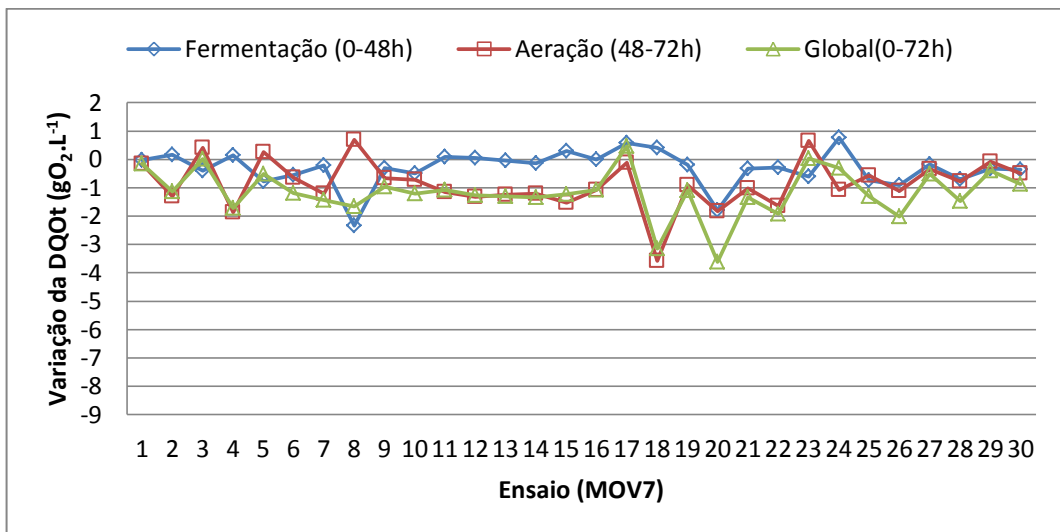


Figura 29 - Variação da DQOt nos ensaios de DCCR conduzidos com inóculo bacteriano (MOV7)

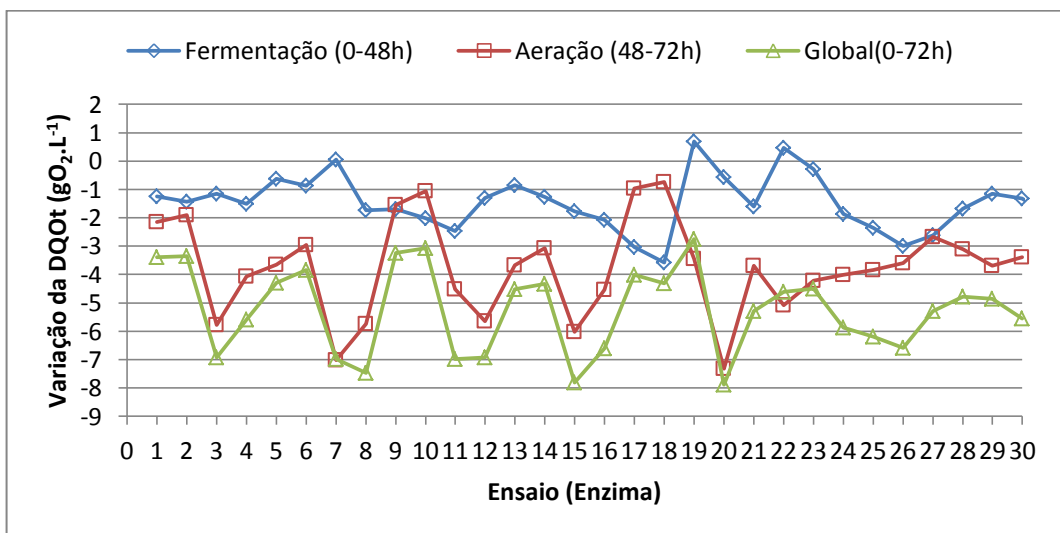


Figura 30 - Variação da DQOt nos ensaios de DCCR com inóculo enzimático (LPP)

Boa parte das lipases são capazes de atuar em ampla faixa de pH e temperatura. Bactérias lipolíticas, em sua maioria, desenvolvem-se melhor e secretam lipase com pH inicial próximo de 7,0, entretanto observa-se que a máxima atividade lipolítica ocorre em pH alcalino, conforme trabalhos citados por Gupta e Gupta (2004). Nestes trabalhos são descritos diferentes grupos bacterianos que possuem melhor faixa de atuação entre 6,8 e 10,6. Além disso, a alcalinização excessiva do meio mostra-se inviável de acordo com os estudos de Masse e colaboradores (2001) na redução das partículas de gordura em sistemas de pré-tratamento com hidrólise enzimática. Resultados insatisfatórios também foram encontrados por Mendes e Castro (2004) utilizando enzimas de pâncreas de porco quando o pH aplicado foi maior que 9,0.

Mobarak-Qamsari e colaboradores (2012) estudaram a estabilidade da lipase extraída de *P. aeruginosa*, encontrando resultados melhores em pH 8,0 e temperatura igual a 30°C e 45°C. Temperaturas mais elevadas no tratamento biológico de gorduras se mostra vantajoso. Os coeficientes de difusão e solubilização dos lipídios aumentam com a elevação da temperatura e com isso esses compostos se tornam mais acessíveis aos micro-organismos e suas enzimas (THOMAS, 1987 *apud* CAMMAROTA E FREIRE, 2006; CHIPASA E MEDRZYCKA, 2006). Porém, é importante ressaltar que o aumento da temperatura, apesar de promover o aumento da atividade enzimática, pode reduzir a estabilidade térmica da mesma, podendo haver desnaturação. Isso foi observado no trabalho de Tsuji e colaboradores (2013), avaliando a lipase produzida por um fungo, onde a temperatura crítica foi de 60°C. Neste mesmo trabalho, foi encontrada maior estabilidade térmica e maior atividade lipolítica em pH 8,0. Trabalhos como os de El-Bestawy, El-Masry, El-Adl (2005), Jeganathan, Bassi e Nakhala (2006) Sirisha, Rajasekar e Narasu (2010) demonstram maior estabilidade térmica das lipases em condições mesofílicas (30 a 37°C).

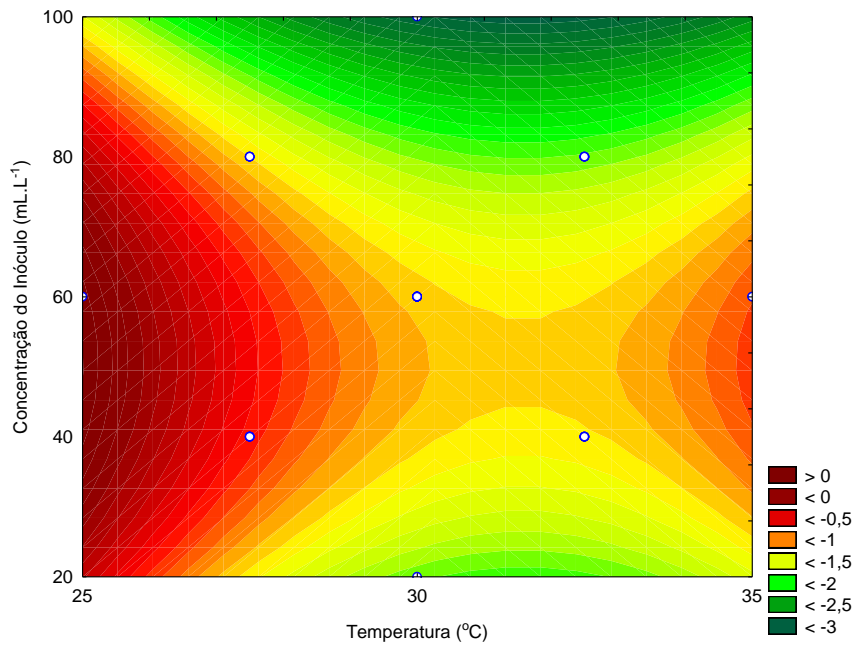


Figura 31 - Curva de contorno da variação global da DQO total em função da concentração do inóculo e da temperatura para MOV7

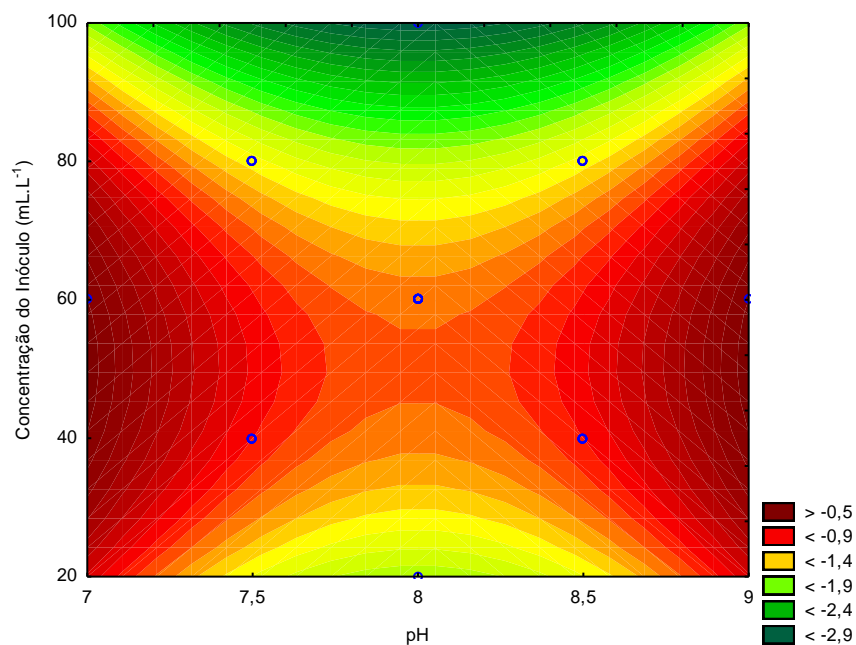


Figura 32 - Curva de contorno da variação global da DQO total em função da concentração do inóculo e do pH para MOV7

Nos ensaios com enzima LPP, a variação global da DQOt foi influenciada pela concentração do inóculo e temperatura (Apêndice J). Observa-se, na Figura 33, que a concentração inicial de enzima influenciou diretamente a variável resposta, para modelo matemático com $R^2 = 0,76$ e $F_{\text{calculado}}$ igual a 42,7.

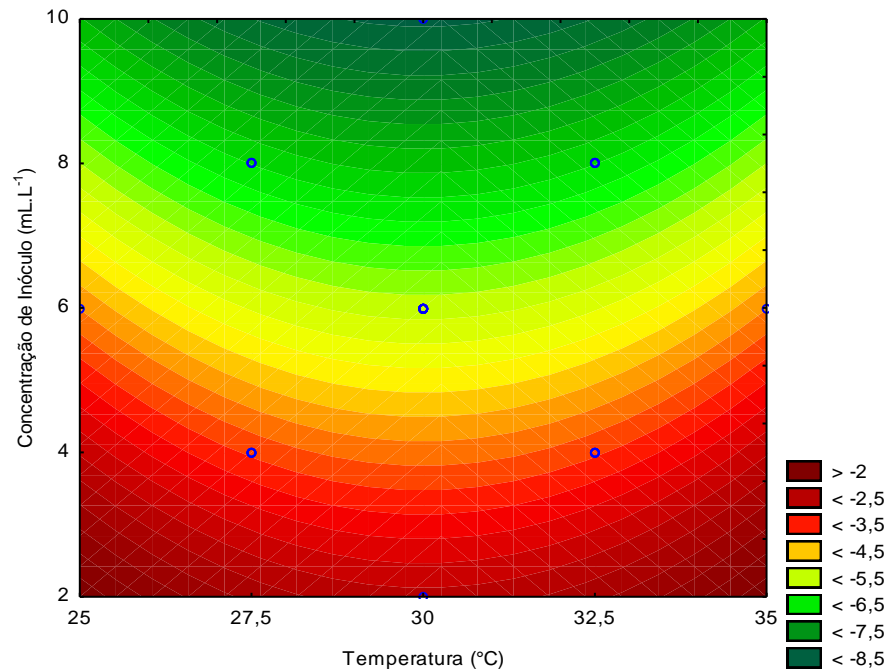


Figura 33 - Curva de contorno da variação global da DQO total em função da concentração do inóculo e da temperatura para enzima LPP

As Figuras 34 e 35 demonstram a tendência de redução global na DQOs em ambos os inóculos, com decréscimo maior para a enzima LPP. Como observado nos ensaios preliminares, a DQO gerada pela enzima LPP é predominantemente solúvel, podendo-se inferir, pela magnitude das reduções, o consumo de matéria orgânica proveniente do inóculo.

O modelo matemático obtido para a variação global de DQOs para MOV7 (Apêndice J), embora apresente $F_{\text{calculado}}$ quase 10 vezes superior ao F_{tabelado} (25,6 e 2,89), pode não representar bem os dados experimentais, pelo baixo valor de R^2 (0,48). A tendência de comportamento está representada na Figura 36, indicando que o pH neutro e alcalino (9) beneficia a solubilização da DQO, enquanto que valores próximos a 8 favorece a redução da DQOs pelos micro-organismos. O modelo matemático que representa a variação da DQOs nos ensaios com enzima LPP repete o comportamento verificado para a DQOt (Figura 37).

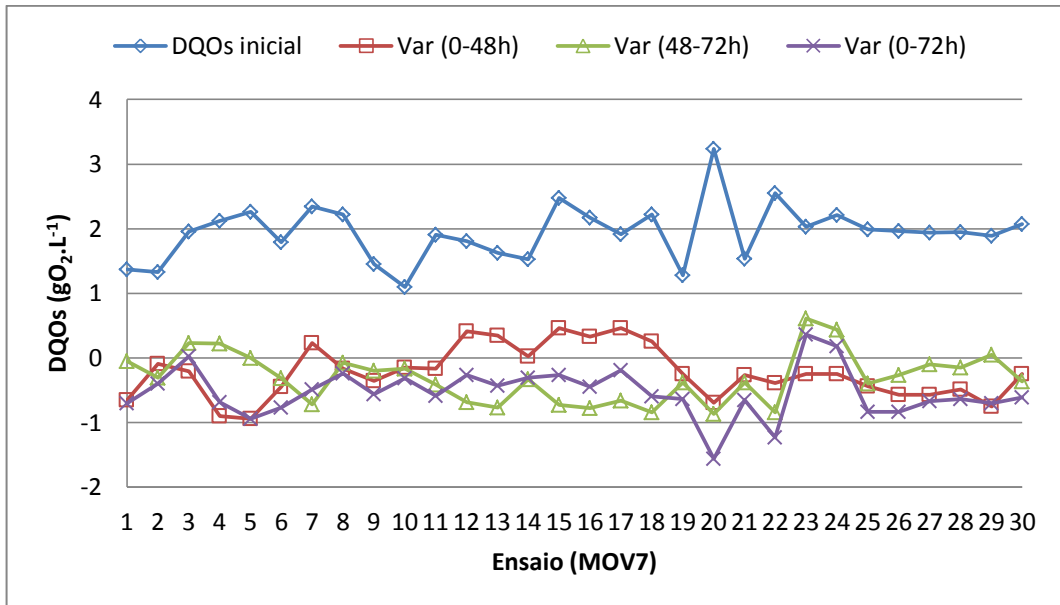


Figura 34 - DQOs inicial e sua variação ao longo do tempo para os ensaios de DCCR inoculados com MOV7

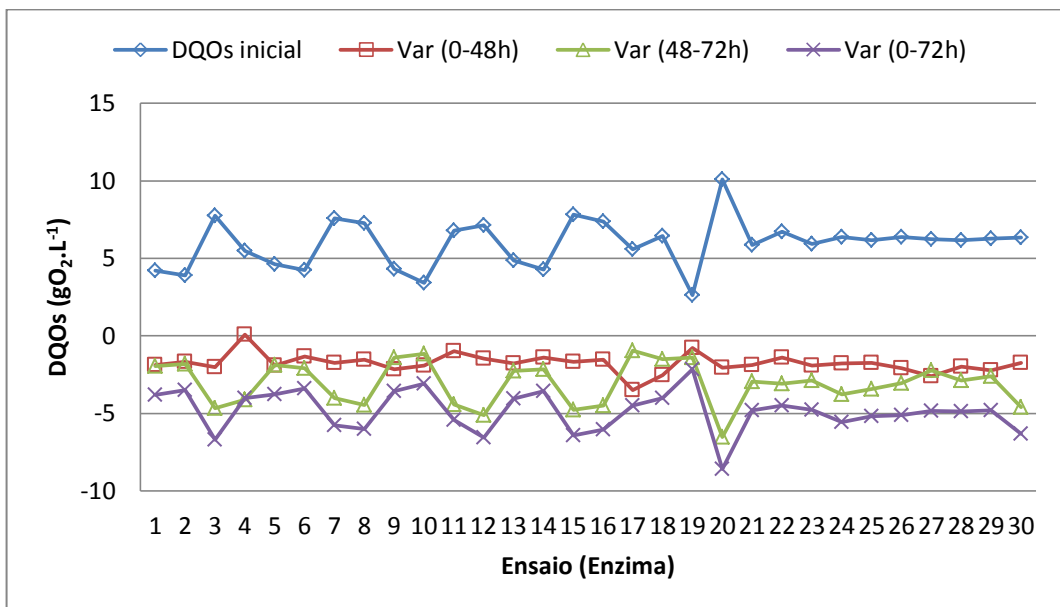


Figura 35 - DQOs inicial sua variação ao longo do tempo nos ensaios de DCCR inoculados com enzima LPP

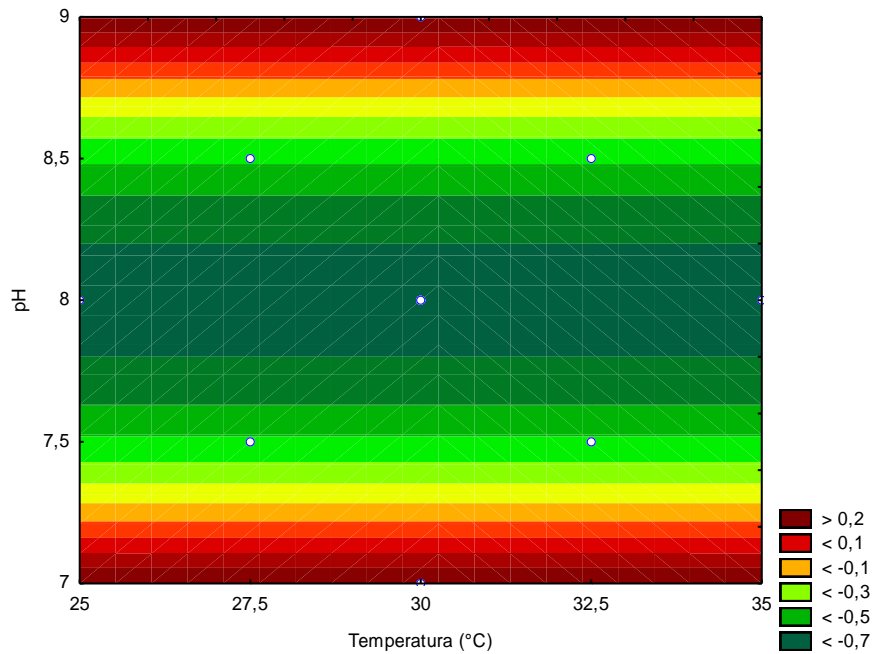


Figura 36- Curva de contorno da variação global da DQO solúvel em função do pH e da temperatura para MOV7

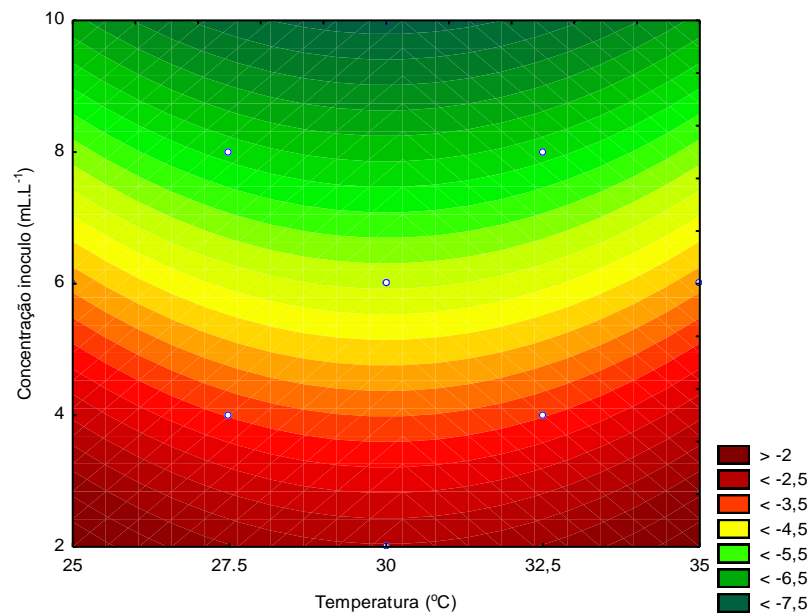


Figura 37 - Curva de contorno da variação global da DQO solúvel em função da concentração do inóculo e da temperatura para enzima LPP

A análise global do pré-tratamento revela redução máxima de aproximadamente 3 gO₂.L⁻¹ com MOV7 e de 7 gO₂.L⁻¹ com enzima LPP. Entretanto, comparando-se com os valores iniciais de DQO nos ensaios, com ambos os inóculos, observa-se que parcela substancial de DQO removida pela enzima, foi resultante da adição de substâncias que a compõe. A redução da DQO_t em ambos inóculos foi maior no período aerado. Esta tendência não confirma o comportamento observado no ensaio 3, possivelmente pelas concentrações

mais baixas dos produtos intermediários, o que possibilita o predomínio do seu consumo em relação a geração. A diluição do efluente, associado a outras variáveis contribuíram para a redução da DQOs na fase aerada para o MOV7, enquanto que a temperatura e concentração do inóculo influenciaram para a enzima LPP (Apêndice J).

5.4.2 Teor de Óleos e Gorduras

A Figura 38 exhibe os valores iniciais do teor de óleos e gorduras dos experimentos inoculados com MOV7 e enzima LPP. De modo geral, o perfil de oscilação das concentrações foi similar para os dois inóculos, com valores superiores para a enzima. Entretanto, nos pontos centrais, verificou-se dispersão nos dados (MOV $1,75 \pm 0,55$ e enzima LPP $2,31 \pm 0,50$). O fato da enzima LPP estar mais rapidamente disponível no meio, comparado à lipase bacteriana, pode ter contribuído de alguma forma para extração da gordura no momento da análise. Quando inoculados com enzima LPP, os ensaios 11 e 12, que apresentavam concentrações maiores de inóculo e pH mais alcalino, se destacam pela maior detecção de lipídios comparado aos ensaios 9 e 10. Mesmo assim, no ensaio 20 da análise global do experimento (Figura 39) obtém-se maior redução de O&G, indicando possível efeito positivo no aumento da concentração do inóculo. Pode-se afirmar que a redução máxima de O&G obtido com este inóculo foi de aproximadamente 2 g.L^{-1} . O gráfico de curvas de contorno para MOV7 (Figura 40) da análise global indica que além da concentração do inóculo, o pH também interfere na redução de O&G. Este comportamento também foi verificado para DQOt indicando redução da carga orgânica pela remoção de O&G.

A Figura 40 demonstra menor variação dos valores de O&G dos ensaios inoculados com enzima LPP, obtendo reduções de O&G também na faixa de 2 g.L^{-1} . As curvas de resposta geradas a partir dos modelos matemáticos (Apêndice J) permite inferir que concentrações maiores de inóculo (10 mg.L^{-1} ou 1% p/v), concentrações intermediárias do efluente ($37,5 \text{ mL.L}^{-1}$) e pH 8 favorecem a redução de O&G (Figuras 41, 42, 43 e 44).

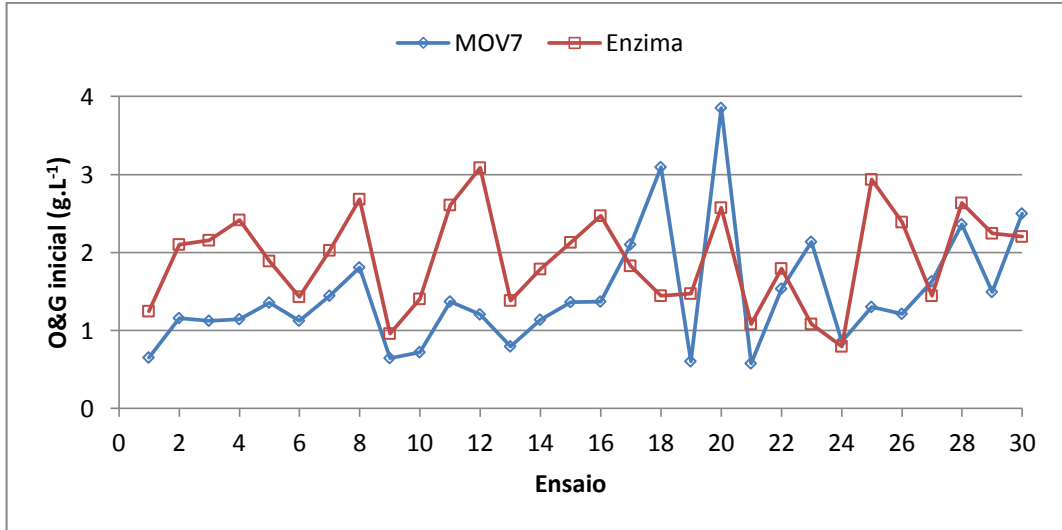


Figura 38 - Concentração inicial de O&G dos ensaios de DCCR inoculados com MOV7 e enzima LPP

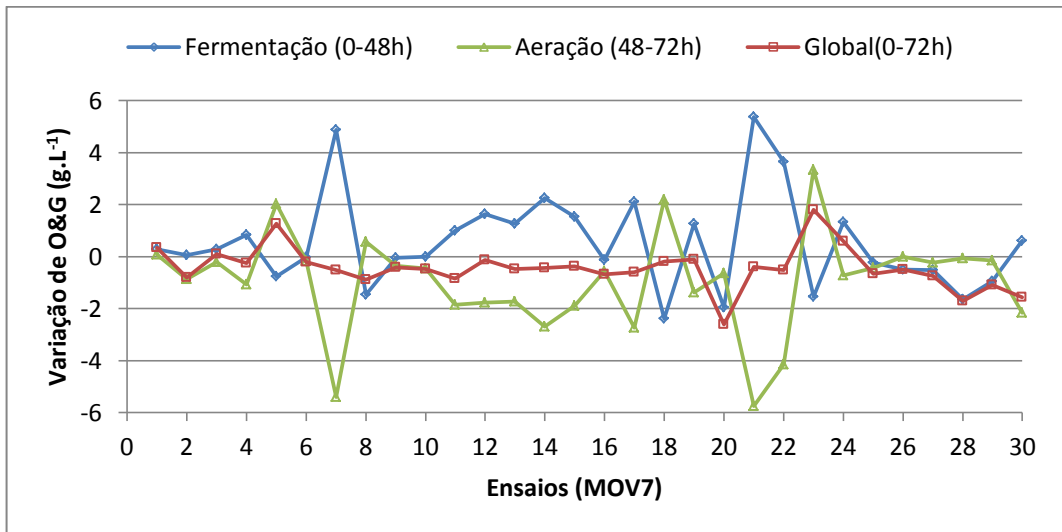


Figura 39 – Variação de O&G dos ensaios de DCCR conduzidos com MOV7

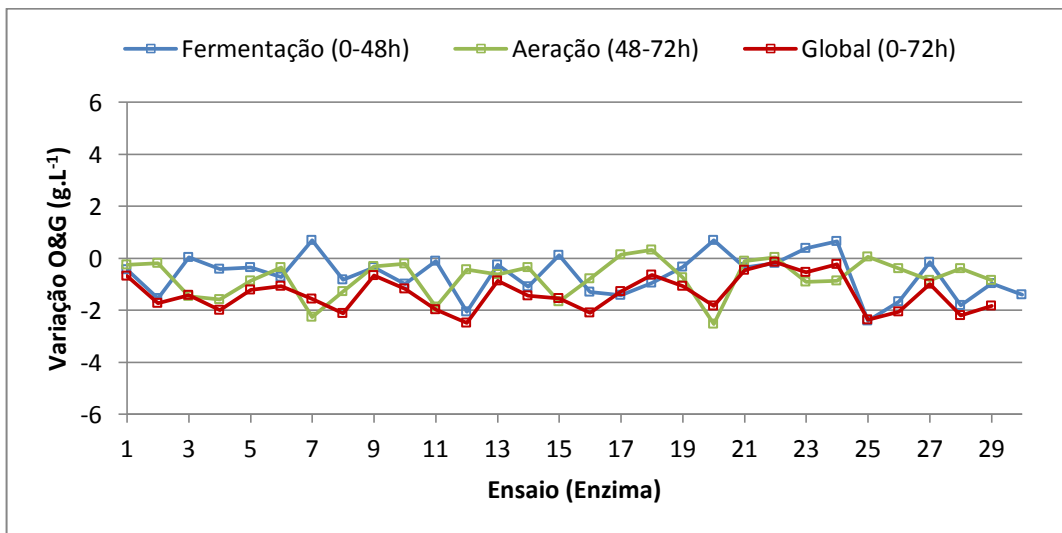


Figura 40 - Variação de O&G dos ensaios de DCCR conduzidos com enzima LPP

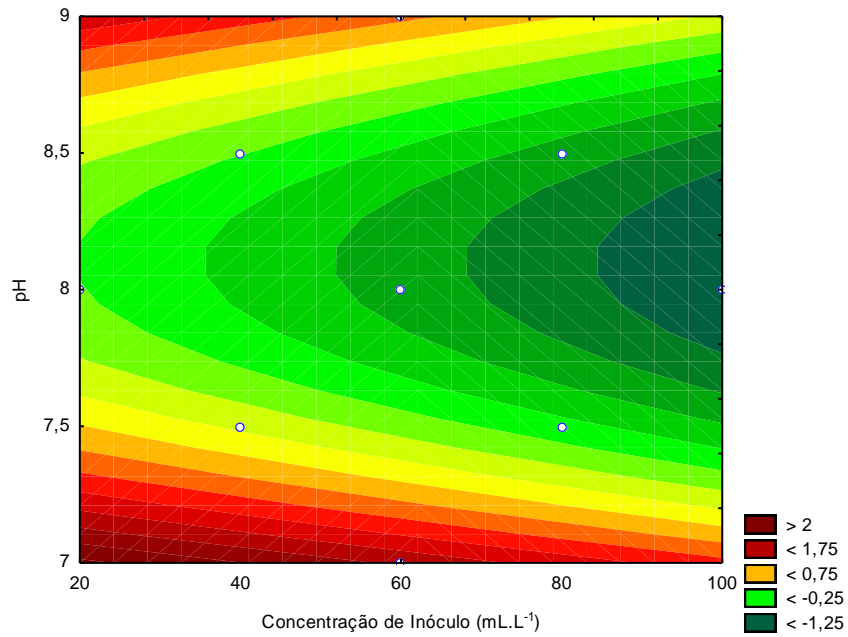


Figura 41 - Curva de contorno da variação global de O&G em função do pH e da concentração do inóculo para MOV7

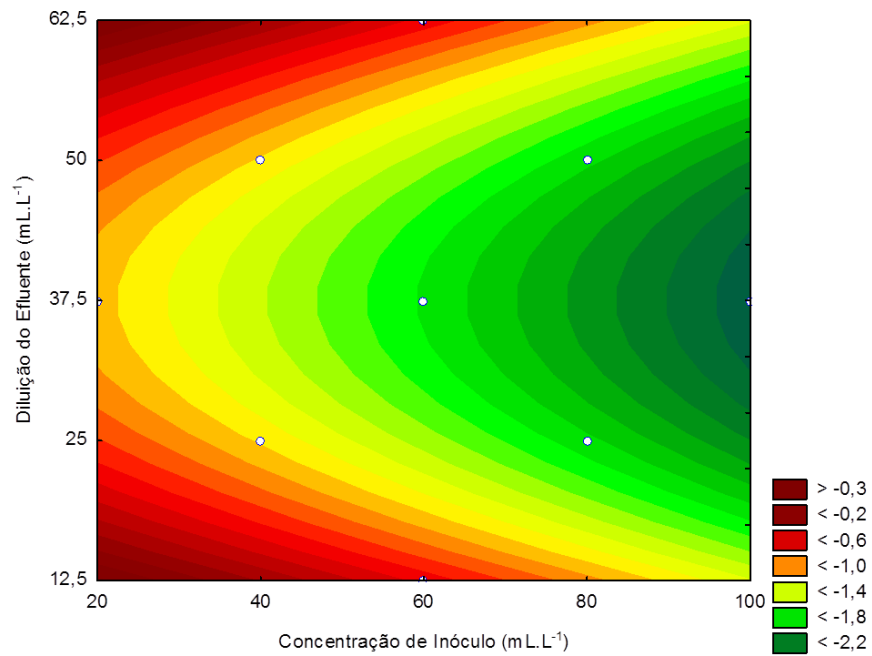


Figura 42 - Curva de contorno da variação global de O&G em função da concentração do efluente e da concentração do inóculo para a enzima LPP

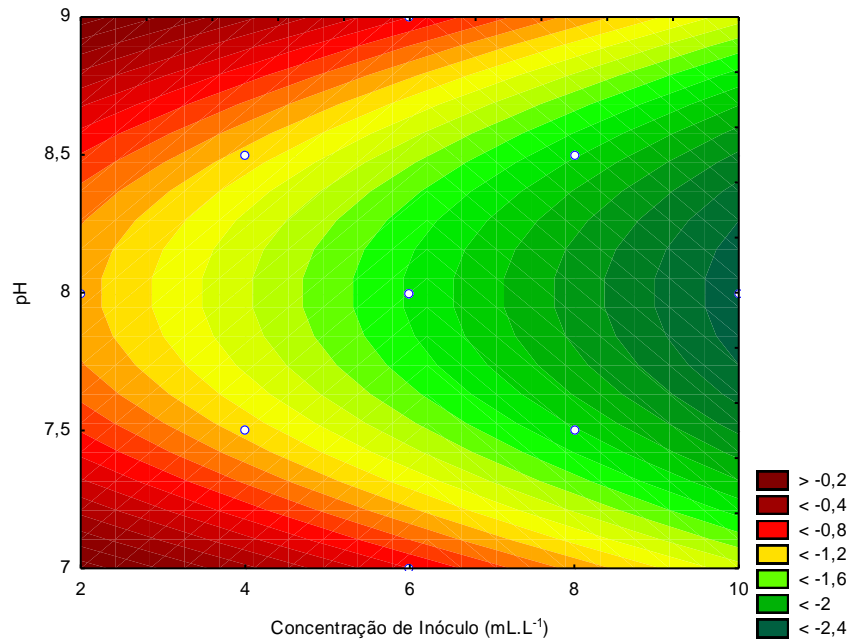


Figura 43 - Curva de contorno da variação global de O&G em função do pH e da concentração do inóculo para a enzima LPP

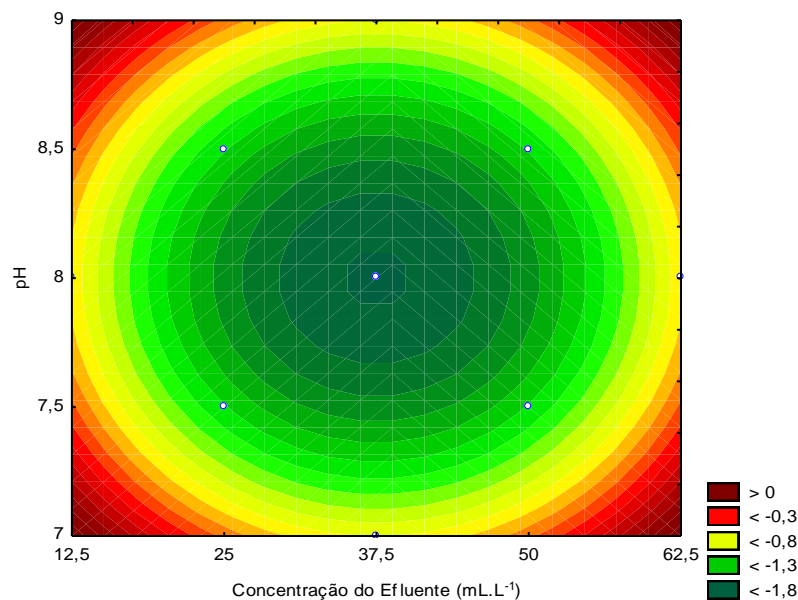


Figura 44 - Curva de contorno da variação global de O&G em função do pH e da concentração do efluente para a enzima LPP

Mendes e Castro (2005) testaram a influência do pH na hidólise. O pH ideal para enzima pancreática suíno foi 7,5. No trabalho de Pereira (2004) lipases de diversas fontes apresentam atividade é máxima em valores diferentes de pH. A inter-relação da atividade com o pH depende de vários fatores, em geral, difíceis de analisar quantitativamente. O autor verificou que a máxima atividade da enzima LPP, Sigma Aldrich[®], similar a utilizada neste trabalho, foi de 5286 U.mg⁻¹ em pH 8 e decréscimo em valores de 7,5 e 8,5.

5.4.3 Índice de Acidez

A análise realizada no início do pré-tratamento (tempo 0 hora) demonstrou que o aumento do índice de acidez dos ensaios inoculados com enzima LPP está relacionado ao aumento da concentração do inóculo. Já os ensaios inoculados com MOV7 apresentaram índice de acidez inicial semelhante em todos os tratamentos. Além disso, a adição de enzima LPP, mesmo em baixas concentrações, promove maior acidez do sistema (aumento de 50 a 80%) comparado à adição de MOV7 nas mesmas condições (Figura 45). Esse resultado demonstra elevada capacidade de hidrólise que a enzima apresenta já nos períodos iniciais do pré-tratamento, aproximadamente 3 horas (período de intervalo entre a amostragem e quantificação do índice de acidez).

A Figura 46 demonstra que nos ensaios com inóculo MOV7 observa-se variação cíclica do índice de acidez, apresentando consumo em temperaturas menores (-1 e -2) e geração de acidez em temperaturas mais elevadas (+1 e +2). De modo geral também se observa a diferença metabólica no período fermentativo (consumo de acidez) e no período aerado (geração de acidez). Estes resultados confirmam a tendência observada no Ensaio 3. A análise global do DCCR indica, por meio dos coeficientes de regressão e análise de variância, e efeito de todas as variáveis no comportamento do IA, no qual valores medianos de todas as variáveis e valores alcalinos de pH favorecem a redução da acidez no sistema (Figuras 48, 49 e 50).

Nos ensaios com inóculo enzimático o comportamento cíclico dependente da temperatura também é observado, havendo maior índice de acidez em temperaturas mais elevadas. Porém o comportamento metabólico dos dois períodos do pré-tratamento se invertem comparado ao inóculo microbiano, havendo predomínio de geração de acidez no período fermentativo e redução de acidez no período aerado (Figura 47). O aumento da concentração do inóculo também interfere positivamente do aumento da acidez conforme observado na figura 51.

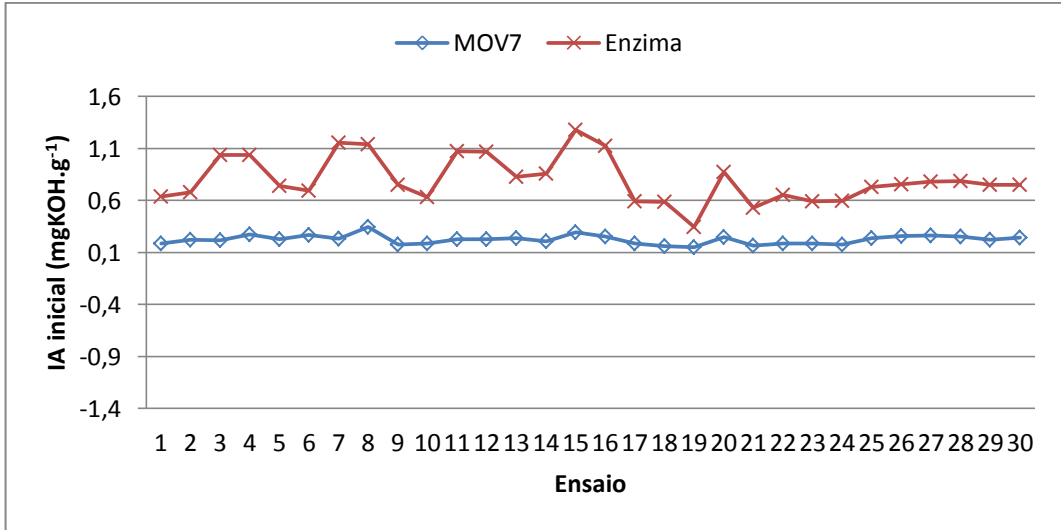


Figura 45 - Índice de Acidez inicial nos ensaios de DCCR inoculados com MOV7 e com Enzima LPP

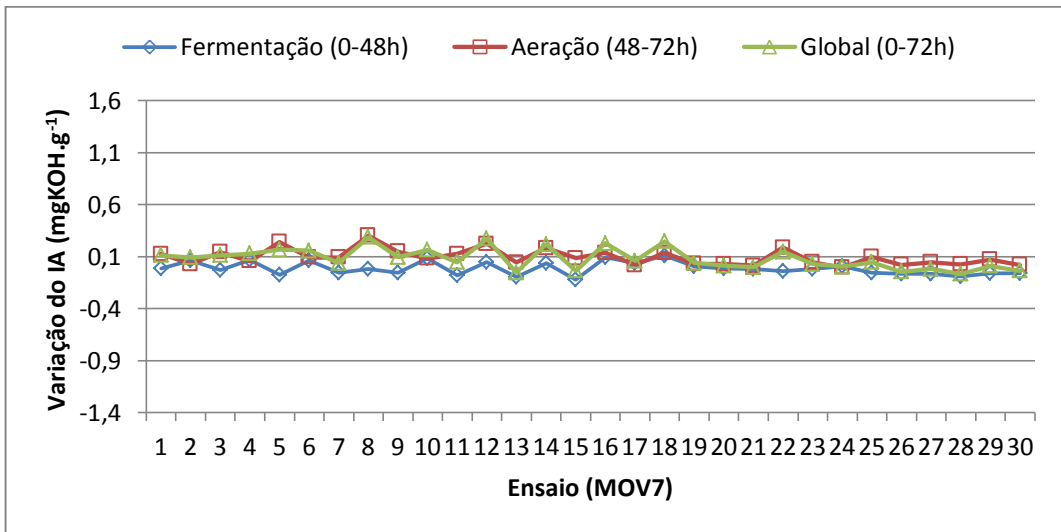


Figura 46 - Variação do Índice de Acidez nos ensaios de DCCR inoculados com MOV7 ao longo do pré-tratamento

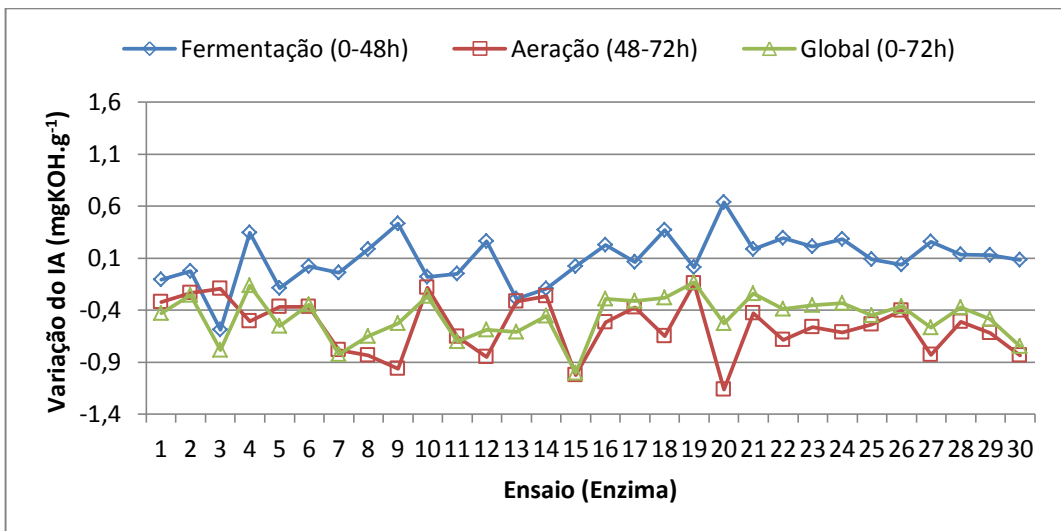


Figura 47 - Variação do Índice de Acidez dos ensaios de DCCR inoculados com Enzima LPP ao longo do pré-tratamento

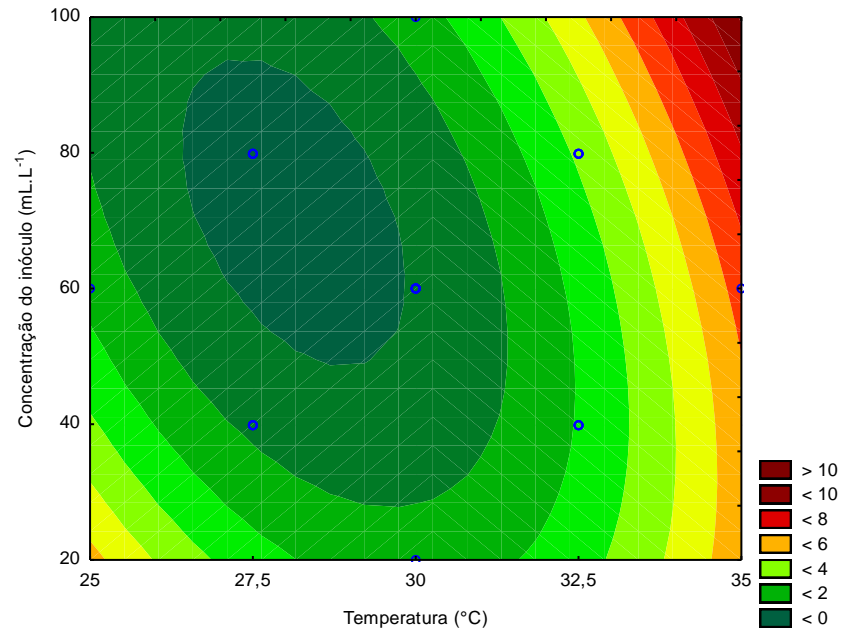


Figura 48 - Curva de contorno da variação global do IA em função da concentração do inóculo e da temperatura para MOV7

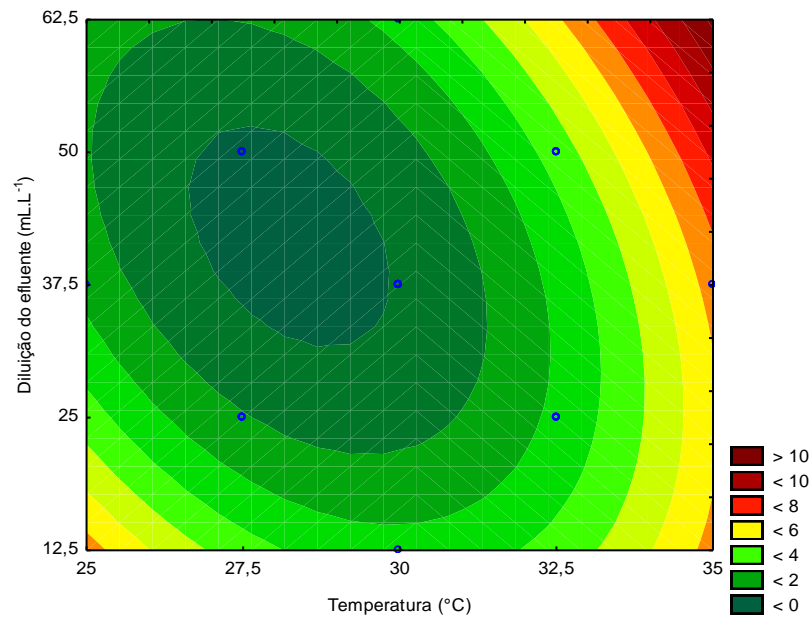


Figura 49 - Curva de contorno da variação global do IA em função da diluição do efluente e da temperatura para MOV7

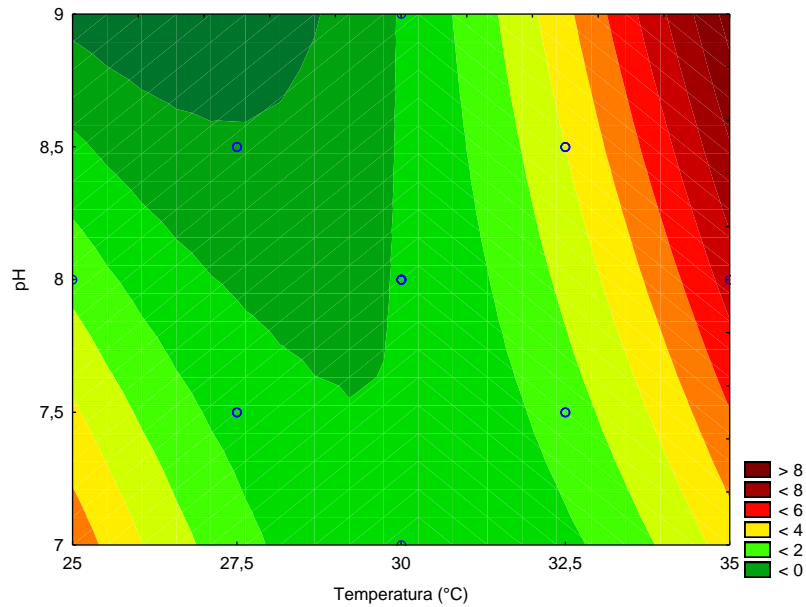


Figura 50 - Curva de contorno da variação global do IA em função do pH e da temperatura para MOV7

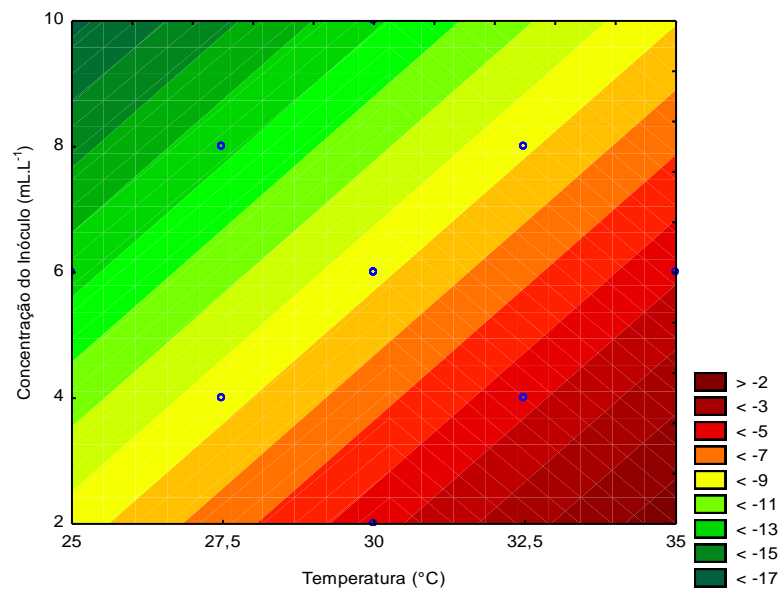


Figura 51 - Curva de contorno da variação global do IA em função da concentração do inóculo e da temperatura para enzima LPP

5.5 Validação dos modelos

Para validação dos modelos foi montado o experimento em duplicata para cada tipo de inóculo. As condições de temperatura (x_1), concentração de inóculo (x_2), concentração de efluente (x_3) e pH (x_4) em que os testes foram conduzidos estão descritos na tabela 12. Nesta tabela também se encontram os valores previstos conforme equação gerada no modelo (Apêndice J) e os valores globais (0 a 72 horas) obtidos no experimento.

Esses resultados demonstraram que os ensaios conduzidos com o inóculo enzimático obtiveram valores mais próximos do que é esperado pelo modelo, comparado aos microorganismos. A baixa adequação ao modelo é esperada, baseando-se no valor de F obtido nas análises. Isso indica que outras variáveis que não foram avaliadas no DCCR influenciam o comportamento do sistema, principalmente para o inóculo bacteriano MOV7.

Tabela 13 - Condições para validação do modelo, variação global dos resultados esperados e obtidos com inóculo MOV7

Inóculo	Variáveis codificadas				Valor previsto				Valor experimental			
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	DQOt	DQOs	O&G	IA	DQOt	DQOs	O&G	IA
MOV7	0	-2	+2	0	-1,85	-0,74	-0,24	1,69	-1,18	-0,10	-0,86	-0,50
LPP	0	0	0	0	-5,62	-4,70	-1,81	-9,28	-4,70	-4,24	-0,25	-5,22

5 CONCLUSÕES

A partir desse trabalho pôde-se concluir que:

- O efluente da graxaria de curtume é uma fonte potencial de bactérias lipolíticas;
- Nos ensaios preliminares:
 - De modo geral, as duas cepas isoladas do efluente de curtume (MOV4 e MOV7), apresentaram comportamento semelhante ao produto comercial Enzilimp[®] com relação à variação de DQO, O&G e IA;
 - A enzima LPP aumenta mais rapidamente o IA, entretanto resulta em aumento da matéria orgânica do meio de 1,1 g DQOt por g de enzima adicionada;
 - No efluente *in natura*, o aumento das concentrações de inóculo não resultaram em melhoria no pré-tratamento.
 - A diluição do efluente em 100 ml.L⁻¹ favoreceu a redução de matéria orgânica no sistema quando inoculados com MOV7 5%.
 - A aeração não favoreceu o metabolismo microbiano na redução de DQO, O&G e IA, porém contribuiu para a redução de O&G nos ensaios com enzima LPP.
 - Encontrou-se melhores resultados na remoção de O&G (75%) e DQOt (47%) no terceiro ensaio com inóculo MOV7 a 5% e efluente a uma diluição de 100 ml.L⁻¹, pH inicial igual a 7,0 e temperatura de 30°C.
- No DCCR:
 - A temperatura e o pH influenciaram significativamente o desempenho do sistema, com melhores resultados a 30°C e 8,0, respectivamente;
 - A redução da DQO, O&G e IA foi maior no período aerado comparado ao período fermentativo tanto para inóculo microbiano quanto para inóculo enzimático, favorecido possivelmente pela maior diluição do efluente.
 - A eficiência global de redução de O&G de MOV7 e enzima LPP foi semelhante.
 - A DQO inserida no sistema pela enzima LPP interfere na interpretação da redução de DQO do sistema.

6 SUGESTÕES

A partir deste trabalho ressaltamos a necessidade de mais estudos, incluindo:

- Aprofundar pesquisas que analisem o metabolismo microbiano.
- Realizar testes para mensuração de glicerol, identificação dos ácidos graxos voláteis liberados, quantificar surfactantes e/ou analisar a adição dos mesmos no sistema.
- Testar o uso de biomassa adaptada em sistemas aerados.
- Comparando efeito da utilização de efluente autoclavado e não autoclavado.

REFERÊNCIAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em: < http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 14 jul. 2014.
- APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 22 ed, Washington, 2005.
- ALBERTON, D., MITCHELL, D. A., CORDOVA, J., ZAMORA, P. P., Krieger, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microspores* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technol. Biotechnol**, 48:(1) 28-35, 2010.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALEXANDRE, V. M. F., VALENTE, A. M., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolyzed with a solid enzyme pool. **Renewable Energy**. 36:3439-3444, 2011.
- BASHEER, S. M., CHELLAPPAN, S., BEENA, P. S., SUKUMARAN, R. K., ELYAS, K. K., CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v.28, n.6, p. 627-638, 2011.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. **Bioquímica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- Brazilian Leather. Disponível em: < <http://brazilianleather.com.br/wp-content/uploads/2013/04/Brazilian-Leather-Book-Mobile-PT1.pdf>>. Acesso em: 14 de jul. 2014.
- CAMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, p. 2195–2210, 2006.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Curtumes**. Série P+L. 21 ed. 76p. São Paulo, 2005.
- CHERNICHARO, C. A. L. Reactores anaeróbios. Princípios de Tratamento Biológico de Águas Residuárias. Belo Horizonte, UFMG, 1997.
- CHIPASA, K. B., MEDRZYCKA, K. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. **J Ind Microbiol Biotechnol**, n.33, p. 635–645, 2006.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>>. Acesso em: 01 ago. 2013.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº430 de 13 de maio de 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em: 01 ago. 2013.

CRISTÓVÃO, R. O., BOTELHO, C. M., MARTINS, R. J. E., LOUREIRO, J. M., BOAVENTURA, R. A. R. Fish canning industry wastewater treatment for water reuse - a case study. **Journal of Cleaner Production**. 1-10, 2014.

DAMASCENO, F. R. C., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. **Colloides and Surfaces B: Biointerfaces**. 95:241-246, 2012.

DORS, G., MENDES, A. A., PEREIRA, E. B., CASTRO, H. F., FURIGO JR, A. Simultaneous enzymatic hydrolysis and anaerobic biodegradation of lipid-rich wastewater from poultry industry. **Appl. Water Sci.**, n.3, p. 343-349, 2013.

EL-BESTAWY, E., AL-FASSI, F., AMER, R., ABUROKBA, R. Biological Treatment of Leather-Tanning Industrial Wastewater Using Free Living Bacteria. **Advances in Life Science and Technology**. v.12, 2013.

EL-BESTAWY, E., EL-MASRY, M. H., EL-ADL, N. E. The potentiality of free Gram-negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, n. 21, p. 815–822, 2005.

FADILE, A., EL HASSANI, F. Z., HALAH, A., MERZOUKI, M., BENLEMLIH, M. Aerobic treatment of lipid rich wastewater by a bacterial consortium. **African Journal of Microbiology Research** 5, 5333-5342, 2011.

GIORDANO, G. **Tratamento e Controle de Efluentes Industriais**. Apostila. UFMT, 2004.

GOMBERT, A. K., PINTO, A. L., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, 35:85-90, 1999.

Guia Brasileiro do Couro. **Dados Estatísticos**. Disponível em: <<http://www.guiabrasileirodocouro.com.br/dados-estatisticos?ano=2013>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 64, p. 763 – 781, 2004.

HABA, E., BRESCO, O., FERRER, C., MARQUÉS, A., BUSQUETS, M., MANRESA, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate, **Enzyme and Microbial Technology**, n.26, p40-44, 2000.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 235–251, 2006.

HENZE, M.; HARREMOES, P.; JANSEN, J.C.; ARVIN, E. **Wastewater treatment: biological and chemical processes**. 2o ed. Springer p. 383 Lyngby, Germany. 1997.

HWU, C. S., TSENG, S. K., YUAN, C. Y., KULIK, Z., LETTINGA, G. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. **Wat. Res.**, v. 32, n. 5, p. 1571-1579, 1998.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tigela. São Paulo, 2008.

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

JEGANATHAN, J., NAKHLA, G., BASSI, A. Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR–UASB system. **Chemosphere**, p. 1492–1501, 2007.

JUNG, F., CAMMAROTA, M.C., FREIRE, D.M.G. Impact of enzymatic prehydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. **Biotechnol. Letters**. vol.24, 1797-1802, 2002.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

MAHDI, B. A., BHATTACHARYA, A., GUPTA A. Enhanced lipase production from *Aeromonas* sp. S1 using Sal deoiled seed cake as novel natural substrate for potential application in dairy wastewater treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 87:418-426, 2012.

MARZZOCO, A., TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MASSE, L., KENNEDY, K. J., CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, n. 77, p. 145-155, 2001.

McCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems. **Concise Reviews in Food Science**. v.65, n.8, 2000.

MENDES, A. A., PEREIRA, E. B., FURIGO Jr., A., CASTRO, H. F. Anaerobic Biodegradability of Dairy Wastewater Pretreated with Porcine Pancreas Lipase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53, n.6, 1279-1284, 2010.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 135-142, 2005.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F. Redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos empregandolipases pancreáticas **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 5, n. 1, p. 31-39, 2004.

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

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

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

METCALF; EDDY. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**. 4ed. New York: McGraw-Hill Book, 1815p. 2003.

MOBARAK-QAMSARI, E., KASRA-KERMANSHAHSI, R., NOSRATI, M., AMANI, T. Enzymatic Pre-Hydrolysis of high fat Content Dairy Wastewater as a Pretreatment for Anaerobic Digestion. **Int. J. Environ. Res**, 6(2):475-480, 2012.

MONGKOLTHANARUK, W., DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 101–105, 2002.

MORAIS, J. L. Estudo da potencialidade de processos oxidativos avançados, isolados e integrados com processos biológicos tradicionais, para tratamento de chorume de aterro sanitário. Curitiba. **Tese** (doutorado Universidade Federal do Paraná). 229f, 2005.

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

PRASAD, M. P., MANJUNATH, K. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. **Indian Journal of Biotechnology**, n. 10, p. 121-124, 2011.

PEREIRA, E. B., FURIGO Jr., A., CASTRO, H. F., REGINATTO, V. S. Degradation of fat and grease in slaughterhouse wastewater by a commercial microbial lipase. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 49, 21-28, 2006

PEREIRA, E. B. Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas. 2004. 154 f. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

RAJAKUMAR, R., MEENAMBAL, T., SARAVANAN, P. M., ANANTHANAYARANAN, P. Treatment of poultry slaughterhouse wastewater in hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor packed with pleated poly vinyl chloride rings. **Bioresource Technology**. 103:116-122, 2012.

RAMANI, K., CHOCKALINGAM, E., SEKARAN, G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 531-535, 2010.

RIBEIRO, A. C. P., CONCEIÇÃO Jr., J. C., ROSA, D. R., FREIRE, D. M. G., CAMMARORA, M. C. Aplicação de enzimas hidrolíticas no tratamento aeróbio de efluentes de laticínios. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química e Iniciação Científica**, 2005.

RINZEMA, A. Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular Sludge Bed Reactors. **Process Biochemistry**, p. 527-537, 1993.

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

RODRIGUES, M. I., LEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2 ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

ROSA, D. R., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. Production and Utilization of a Novel Solid Enzymatic Preparation Produced by *Penicillium restrictum* Activated Sludge Systems Treating Wastewater with High Levels of Oil and Grease. **Environmental Engineering Science**, v.23, n.5, 2006.

ROSA, D. R. Tratamento enzimático/biológico de efluente com alto teor de gordura. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 2004.

SAM-SOON, P. A. L., LOEWENTHAL, R. E., WENTZEL, M. C., MARAIS, G. R. A long-chain fatty acid, oleate, as sole substrate in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor systems. **Water SA**, 17:31–36, 1991.

SHARMA, R., SONI, S. K., VOHRA, R. M., GUPTA, L. K., GUPTA, J. K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v.37, n.10, 1075-1084, 2002.

SIRISHA, E., RAJASEKAR, N., NARASU, M. L. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. **Advances in Biological Research**, v. 4, n. 5, p. 249-252, 2010.

SUEHARA, K. KAWAMOTO, Y., FUJII, E., KOHDA, J., NAKANO, Y., YANO., T. Biological Treatment of Wastewater Discharged from Biodiesel Fuel Production Plant with Alkali-Catalyzed Transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n.4, p. 437-442, 2005.

TAE. **Revista especializada em tratamento de água e efluentes**. Disponível em: <<http://www.revistatae.com.br/noticiaInt.asp?id=5801>>. Acesso em: 14 fev. 2015.

TSUJI, M., YOKOTA, Y., SHIMOHARA, K., KUDOH, S., HOSHINO, T. An Application of Wastewater Treatment in a Cold Environment and Stable Lipase Production of Antarctic Basidiomycetous Yeast *Mrakia blollopis*. **Plos one**. v.8, 2013.

VALLADÃO, A. B. G., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. Performance of an Anaerobic Reactor Treating Poultry Abattoir Wastewater with High Fat Content After Enzymatic Hydrolysis. **Environmental Engineering Science**. v. 28, n. 4, 2011.

VALLADÃO A. B. G., FREIRE D. M. G., CAMMAROTA M. C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **Int Biodeter Biodegr**; 60:219-25, 2007

VALENTE, A. M., ALEXANDRE, V. M., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e tecnologia de alimentos**, 30(2): 483-488, 2010.

VIEIRA, T. M., SILVA, E. P., ANTONIOSI FILHO, N. R., VIEIRA, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. 2006.

VIJAYARAGHAVAN, K., AHMAD, D., AZIZ, M. E. B. A. Aerobic treatment of palm oil mill effluent. **Journal of Environmental Management**. 82:24-31, 2007.

VOET, D., VOET, J. G. **Bioquímica**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ZAWADZKI, R. A. F. O., PRADO, M. R., MITCHELL, D. A., KRIEGER, N. Continuous Enzymatic Prehydrolysis Treatment of High-Fat Wastewater. **Food Technol. Biotechnol**. 51 (2): 293-300, 2013.

APENDICES

Apêndice A - Variação de DQOt e DQOs

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Bactéria (MOV7)						Enzima (LPP)					
					DQOt (gO ₂ .L ⁻¹)			DQOs (gO ₂ .L ⁻¹)			DQOt (gO ₂ .L ⁻¹)			DQOs (gO ₂ .L ⁻¹)		
					0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h
1	-1	-1	-1	-1	-0,02	-0,15	-0,16	-0,65	-0,05	-0,70	-1,24	-2,15	-3,39	-1,87	-1,95	-3,82
2	1	-1	-1	-1	0,16	-1,31	-1,14	-0,09	-0,31	-0,40	-1,44	-1,90	-3,34	-1,67	-1,82	-3,49
3	-1	1	-1	-1	-0,39	0,40	0,01	-0,21	0,23	0,02	-1,15	-5,78	-6,93	-2,03	-4,66	-6,69
4	1	1	-1	-1	0,15	-1,87	-1,72	-0,90	0,22	-0,68	-1,51	-4,08	-5,59	0,10	-4,13	-4,03
5	-1	-1	1	-1	-0,77	0,26	-0,51	-0,94	0,00	-0,94	-0,63	-3,66	-4,30	-1,90	-1,88	-3,78
6	1	-1	1	-1	-0,55	-0,65	-1,20	-0,45	-0,32	-0,77	-0,88	-2,97	-3,84	-1,33	-2,07	-3,41
7	-1	1	1	-1	-0,22	-1,21	-1,43	0,23	-0,72	-0,49	0,05	-7,03	-6,98	-1,73	-4,03	-5,76
8	1	1	1	-1	-2,34	0,68	-1,66	-0,17	-0,07	-0,24	-1,73	-5,74	-7,47	-1,54	-4,47	-6,00
9	-1	-1	-1	1	-0,30	-0,66	-0,96	-0,36	-0,20	-0,56	-1,70	-1,54	-3,23	-2,16	-1,42	-3,58
10	1	-1	-1	1	-0,49	-0,72	-1,21	-0,15	-0,16	-0,32	-2,01	-1,05	-3,06	-1,92	-1,17	-3,09
11	-1	1	-1	1	0,08	-1,16	-1,07	-0,17	-0,41	-0,59	-2,47	-4,52	-6,98	-1,00	-4,42	-5,42
12	1	1	-1	1	0,06	-1,32	-1,26	0,41	-0,68	-0,27	-1,29	-5,64	-6,93	-1,46	-5,10	-6,57
13	-1	-1	1	1	-0,05	-1,24	-1,29	0,34	-0,77	-0,43	-0,84	-3,67	-4,52	-1,78	-2,26	-4,04
14	1	-1	1	1	-0,13	-1,21	-1,34	0,02	-0,33	-0,31	-1,27	-3,06	-4,33	-1,42	-2,16	-3,58
15	-1	1	1	1	0,30	-1,53	-1,22	0,46	-0,73	-0,27	-1,78	-6,03	-7,81	-1,66	-4,76	-6,42
16	1	1	1	1	<0,01	-1,09	-1,09	0,33	-0,78	-0,45	-2,07	-4,54	-6,61	-1,54	-4,49	-6,03
17	-2	0	0	0	0,58	-0,12	0,46	0,46	-0,66	-0,20	-3,04	-0,96	-4,00	-3,51	-0,96	-4,48
18	2	0	0	0	0,15	-1,16	-1,01	0,25	-0,85	-0,60	-3,58	-0,74	-4,32	-2,53	-1,49	-4,02
19	0	-2	0	0	-0,20	-0,90	-1,10	-0,25	-0,38	-0,63	0,68	-3,44	-2,76	-0,77	-1,40	-2,17
20	0	2	0	0	-1,79	-1,83	-3,62	-0,70	-0,87	-1,56	-0,56	-7,32	-7,88	-2,05	-6,54	-8,59
21	0	0	-2	0	-0,33	-1,01	-1,34	-0,27	-0,38	-0,65	-1,60	-3,69	-5,28	-1,87	-2,95	-4,82
22	0	0	2	0	-0,29	-1,64	-1,93	-0,39	-0,84	-1,23	0,46	-5,08	-4,61	-1,39	-3,10	-4,49
23	0	0	0	-2	-0,61	0,65	0,04	-0,25	0,61	0,36	-0,28	-4,21	-4,49	-1,92	-2,87	-4,78
24	0	0	0	2	0,77	-1,09	-0,31	-0,25	0,43	0,18	-1,87	-4,00	-5,87	-1,78	-3,77	-5,55
25	0	0	0	0	-0,74	-0,57	-1,31	-0,44	-0,40	-0,84	-2,36	-3,84	-6,20	-1,76	-3,44	-5,20
26	0	0	0	0	-0,90	-1,12	-2,02	-0,57	-0,26	-0,84	-3,00	-3,59	-6,59	-2,07	-3,05	-5,13
27	0	0	0	0	-0,17	-0,35	-0,52	-0,57	-0,10	-0,67	-2,61	-2,68	-5,30	-2,61	-2,23	-4,85
28	0	0	0	0	-0,70	-0,77	-1,46	-0,49	-0,15	-0,63	-1,67	-3,11	-4,78	-1,98	-2,89	-4,87
29	0	0	0	0	-0,32	-0,08	-0,40	-0,75	0,05	-0,70	-1,16	-3,70	-4,86	-2,21	-2,60	-4,81
30	0	0	0	0	-0,37	-0,49	-0,86	-0,25	-0,37	-0,62	-1,33	-6,85	-8,18	-1,75	-4,59	-6,33

Apêndice B - Variação de O&G e IA

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Bactéria (MOV7)						Enzima (LPP)					
					O&G (g.L ⁻¹)			IA (mgKOH.g ⁻¹)			O&G (g.L ⁻¹)			IA (mgKOH.g ⁻¹)		
					0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h
1	-1	-1	-1	-1	0,28	0,07	0,35	-0,26	2,52	2,26	-0,43	-0,26	-0,69	-2,09	-6,42	-8,51
2	1	-1	-1	-1	0,06	-0,86	-0,80	1,30	0,56	1,86	-1,54	-0,19	-1,73	-0,44	-4,63	-5,07
3	-1	1	-1	-1	0,29	-0,20	0,09	-0,58	2,85	2,27	0,04	-1,46	-1,42	-11,68	-3,86	-15,54
4	1	1	-1	-1	0,84	-1,08	-0,24	1,40	1,15	2,55	-0,41	-1,58	-1,99	6,84	-10,12	-3,27
5	-1	-1	1	-1	-0,75	2,02	1,27	-1,49	4,82	3,34	-0,36	-0,87	-1,22	-3,76	-7,28	-11,04
6	1	-1	1	-1	-0,03	-0,17	-0,20	1,24	1,86	3,10	-0,71	-0,36	-1,07	0,41	-7,35	-6,94
7	-1	1	1	-1	4,88	-5,40	-0,52	-1,05	1,82	0,77	0,69	-2,25	-1,56	-0,77	-15,62	-16,38
8	1	1	1	-1	-1,46	0,57	-0,89	-0,33	6,05	5,72	-0,83	-1,28	-2,11	3,67	-16,56	-12,89
9	-1	-1	-1	1	-0,05	-0,36	-0,41	-1,04	2,96	1,91	-0,34	-0,32	-0,66	8,62	-19,14	-10,52
10	1	-1	-1	1	-0,01	-0,46	-0,47	1,63	1,63	3,25	-0,98	-0,20	-1,18	-1,64	-3,68	-5,32
11	-1	1	-1	1	1,01	-1,85	-0,84	-1,60	2,53	0,93	-0,11	-1,86	-1,98	-0,97	-12,99	-13,96
12	1	1	-1	1	1,64	-1,76	-0,12	0,98	4,42	5,40	-2,05	-0,43	-2,48	5,19	-16,93	-11,74
13	-1	-1	1	1	1,27	-1,74	-0,47	-1,93	0,85	-1,08	-0,24	-0,62	-0,86	-5,81	-6,32	-12,14
14	1	-1	1	1	2,24	-2,69	-0,44	0,74	3,62	4,36	-1,09	-0,36	-1,45	-3,82	-5,27	-9,09
15	-1	1	1	1	1,53	-1,90	-0,36	-2,37	1,68	-0,70	0,12	-1,67	-1,55	0,41	-20,38	-19,97
16	1	1	1	1	-0,13	-0,56	-0,69	1,83	2,71	4,55	-1,30	-0,79	-2,09	4,51	-10,29	-5,77
17	-2	0	0	0	2,12	-2,72	-0,60	0,80	0,38	1,17	-1,42	0,15	-1,27	1,21	-7,39	-6,17
18	2	0	0	0	-2,38	2,20	-0,18	2,21	2,71	4,92	-0,95	0,32	-0,63	7,34	-12,90	-5,56
19	0	-2	0	0	1,26	-1,37	-0,11	0,17	0,61	0,78	-0,33	-0,74	-1,07	0,19	-2,78	-2,59
20	0	2	0	0	-1,96	-0,64	-2,60	-0,31	0,57	0,26	0,70	-2,54	-1,84	12,71	-23,14	-10,43
21	0	0	-2	0	5,37	-5,76	-0,39	-0,35	0,28	-0,07	-0,36	-0,11	-0,46	3,75	-8,50	-4,75
22	0	0	2	0	3,64	-4,16	-0,52	-0,81	3,71	2,90	-0,19	0,05	-0,15	5,87	-13,61	-7,74
23	0	0	0	-2	-1,55	3,34	1,80	-0,34	0,92	0,58	0,38	-0,91	-0,53	4,20	-11,22	-7,02
24	0	0	0	2	1,32	-0,72	0,60	0,17	-0,10	0,07	0,65	-0,87	-0,22	5,61	-12,17	-6,56
25	0	0	0	0	-0,24	-0,43	-0,67	-1,05	1,95	0,90	-2,41	0,05	-2,36	1,75	-10,71	-8,95
26	0	0	0	0	-0,49	0,00	-0,49	-1,33	0,43	-0,90	-1,66	-0,40	-2,06	0,77	-7,99	-7,22
27	0	0	0	0	-0,52	-0,23	-0,75	-1,26	0,94	-0,33	-0,14	-0,84	-0,98	5,15	-16,47	-11,32
28	0	0	0	0	-1,64	-0,07	-1,71	-1,85	0,53	-1,32	-1,81	-0,40	-2,21	2,69	-10,14	-7,44
29	0	0	0	0	-0,95	-0,15	-1,09	-1,20	1,43	0,23	-0,98	-0,85	-1,83	2,60	-12,27	-9,67
30	0	0	0	0	0,61	-2,16	-1,55	-1,17	0,44	-0,73	-1,40	-0,80	-2,21	1,70	-16,61	-14,91

Apêndice C - Coeficiente de regressão das análises de DQOt e DQOs para os ensaios com efluente bacteriano e enzimático no período fermentativo. CR=Coeficiente de Regressão. EP=Erro Padrão. LI=Limite Inferior. LS=Limite Superior.

Inóculo	Var	DQOt 0-48h						DQOs 0-48h					
		CR	EP	T	p	LI	LS	CR	EP	T	P	LI	LS
Bacteriano (MOV7)	Mean	-0,53	0,18	-2,88	0,0114	-0,86	-0,21	-0,51	0,14	-3,53	0,0030	-0,77	-0,26
	x ₁ (L)	-0,11	0,09	-1,19	0,2508	-0,54	0,10	-0,01	0,07	-0,08	0,9394	-0,26	0,24
	x ₁ (Q)	0,21	0,09	2,47	0,0259	0,12	0,73	0,22	0,07	3,28	0,0050	0,21	0,68
	x ₂ (L)	-0,14	0,09	-1,53	0,1467	-0,61	0,04	0,06	0,07	0,79	0,4397	-0,14	0,37
	x ₂ (Q)	-0,13	0,09	-1,47	0,1616	-0,56	0,05	0,01	0,07	0,22	0,8304	-0,21	0,27
	x ₃ (L)	-0,12	0,09	-1,33	0,2044	-0,57	0,08	0,07	0,07	0,98	0,3410	-0,11	0,40
	x ₃ (Q)	0,04	0,09	0,51	0,6151	-0,21	0,39	0,05	0,07	0,75	0,4663	-0,14	0,34
	x ₄ (L)	0,26	0,09	2,81	0,0133	0,19	0,84	0,17	0,07	2,35	0,0331	0,09	0,59
	x ₄ (Q)	0,14	0,09	1,65	0,1193	-0,02	0,59	0,07	0,07	1,04	0,3146	-0,10	0,38
	x ₁ x ₂	-0,13	0,11	-1,13	0,2780	-0,65	0,14	-0,10	0,09	-1,12	0,2810	-0,51	0,11
	x ₁ x ₃	-0,17	0,11	-1,54	0,1435	-0,75	0,05	-0,06	0,09	-0,72	0,4811	-0,44	0,18
	x ₁ x ₄	0,04	0,11	0,32	0,7557	-0,33	0,47	0,02	0,09	0,28	0,7868	-0,26	0,36
	x ₂ x ₃	-0,08	0,11	-0,72	0,4819	-0,56	0,23	0,09	0,09	1,05	0,3102	-0,12	0,50
	x ₂ x ₄	0,19	0,11	1,69	0,1113	-0,01	0,78	0,01	0,09	0,07	0,9460	-0,30	0,32
	x ₃ x ₄	0,28	0,11	2,51	0,0238	0,17	0,97	0,06	0,09	0,64	0,5338	-0,20	0,42
Enzimático (LPP)	Mean	-2,02	0,23	-8,70	0,0000	-2,43	-1,61	-2,06	0,22	-9,20	0,0000	-2,46	-1,67
	x ₁ (L)	-0,15	0,12	-1,26	0,2255	-0,70	0,11	0,22	0,11	1,98	0,0661	0,05	0,84
	x ₁ (Q)	-0,35	0,11	-3,19	0,0061	-1,07	-0,31	-0,17	0,10	-1,62	0,1269	-0,71	0,03
	x ₂ (L)	-0,18	0,12	-1,59	0,1332	-0,78	0,04	0,03	0,11	0,23	0,8202	-0,34	0,44
	x ₂ (Q)	0,50	0,11	4,56	0,0004	0,61	1,37	0,23	0,10	2,22	0,0419	0,10	0,83
	x ₃ (L)	0,32	0,12	2,79	0,0138	0,24	1,06	0,00	0,11	0,02	0,9822	-0,39	0,40
	x ₃ (Q)	0,34	0,11	3,11	0,0072	0,30	1,06	0,18	0,10	1,70	0,1096	-0,01	0,72
	x ₄ (L)	-0,34	0,12	-2,89	0,0112	-1,08	-0,26	-0,03	0,11	-0,26	0,7995	-0,45	0,34
	x ₄ (Q)	0,21	0,11	1,95	0,0706	0,04	0,80	0,12	0,10	1,18	0,2575	-0,12	0,61
	x ₁ x ₂	-0,01	0,14	-0,04	0,9706	-0,51	0,49	0,04	0,14	0,27	0,7892	-0,41	0,56
	x ₁ x ₃	-0,19	0,14	-1,33	0,2021	-0,88	0,12	-0,05	0,14	-0,38	0,7069	-0,59	0,38
	x ₁ x ₄	0,17	0,14	1,19	0,2508	-0,16	0,84	-0,18	0,14	-1,28	0,2189	-0,83	0,13
	x ₂ x ₃	-0,12	0,14	-0,83	0,4194	-0,74	0,26	-0,20	0,14	-1,48	0,1587	-0,89	0,07
	x ₂ x ₄	-0,10	0,14	-0,72	0,4807	-0,71	0,29	0,00	0,14	0,02	0,9869	-0,48	0,49
	x ₃ x ₄	-0,04	0,14	-0,28	0,7803	-0,58	0,42	0,07	0,14	0,54	0,5979	-0,33	0,63

Apêndice D - Coeficiente de regressão das análises de DQOt e DQOs para os ensaios com efluente bacteriano e enzimático no período aerado. CR=Coeficiente de Regressão. EP=Erro Padrão. LI=Limite Inferior. LS=Limite Superior.

Inóculo	Var	DQOt 48-72h						DQOs 48-72h					
		CR	EP	T	p	LI	LS	CR	EP	T	P	LI	LS
Bacteriano (MOV7)	Mean	-0,56	0,21	-2,62	0,0194	-0,94	-0,19	-0,20	0,09	-2,16	0,0470	-0,37	-0,04
	x ₁ (L)	-0,18	0,11	-1,65	0,1194	-0,73	0,02	-0,01	0,05	-0,14	0,8906	-0,18	0,15
	x ₁ (Q)	0,00	0,10	-0,04	0,9654	-0,36	0,34	-0,13	0,04	-2,92	0,0106	-0,41	-0,10
	x ₂ (L)	-0,14	0,11	-1,26	0,2257	-0,65	0,11	-0,07	0,05	-1,57	0,1369	-0,31	0,02
	x ₂ (Q)	-0,19	0,10	-1,85	0,0841	-0,72	-0,02	-0,10	0,04	-2,19	0,0443	-0,35	-0,04
	x ₃ (L)	-0,02	0,11	-0,18	0,8634	-0,41	0,34	-0,14	0,05	-2,88	0,0113	-0,44	-0,11
	x ₃ (Q)	-0,18	0,10	-1,74	0,1016	-0,70	0,00	-0,09	0,04	-2,13	0,0505	-0,34	-0,03
	x ₄ (L)	-0,36	0,11	-3,32	0,0047	-1,09	-0,34	-0,14	0,05	-3,01	0,0087	-0,45	-0,12
	x ₄ (Q)	0,10	0,10	1,00	0,3318	-0,15	0,55	0,19	0,04	4,30	0,0006	0,22	0,53
	x ₁ x ₂	0,12	0,13	0,94	0,3598	-0,21	0,71	0,03	0,06	0,45	0,6604	-0,15	0,25
	x ₁ x ₃	0,32	0,13	2,43	0,0282	0,18	1,10	0,08	0,06	1,32	0,2071	-0,05	0,36
	x ₁ x ₄	0,17	0,13	1,28	0,2197	-0,12	0,80	0,01	0,06	0,11	0,9174	-0,19	0,22
	x ₂ x ₃	0,05	0,13	0,39	0,7033	-0,36	0,56	-0,06	0,06	-1,04	0,3141	-0,32	0,08
	x ₂ x ₄	-0,07	0,13	-0,53	0,6056	-0,60	0,32	-0,09	0,06	-1,60	0,1315	-0,39	0,02
	x ₃ x ₄	-0,20	0,13	-1,52	0,1483	-0,86	0,06	0,00	0,06	0,07	0,9483	-0,20	0,21
Enzimático (LPP)	Mean	-3,96	0,43	-9,28	0,0000	-4,71	-3,21	-3,13	0,23	-13,58	0,0000	-3,54	-2,73
	x ₁ (L)	0,24	0,21	1,14	0,2716	-0,26	1,24	-0,05	0,12	-0,39	0,7005	-0,50	0,31
	x ₁ (Q)	0,73	0,20	3,66	0,0023	0,76	2,16	0,43	0,11	3,97	0,0012	0,48	1,24
	x ₂ (L)	-1,30	0,21	-6,07	0,0000	-3,34	-1,84	-1,32	0,12	-11,41	0,0000	-3,04	-2,23
	x ₂ (Q)	-0,40	0,20	-2,01	0,0627	-1,50	-0,10	-0,26	0,11	-2,38	0,0307	-0,89	-0,14
	x ₃ (L)	-0,53	0,21	-2,50	0,0243	-1,82	-0,32	-0,07	0,12	-0,63	0,5382	-0,55	0,26
	x ₃ (Q)	-0,15	0,20	-0,76	0,4606	-1,00	0,40	-0,02	0,11	-0,19	0,8484	-0,42	0,34
	x ₄ (L)	0,15	0,21	0,72	0,4842	-0,44	1,05	-0,11	0,12	-0,93	0,3673	-0,62	0,19
	x ₄ (Q)	-0,08	0,20	-0,41	0,6852	-0,86	0,53	-0,09	0,11	-0,87	0,3966	-0,57	0,19
	x ₁ x ₂	0,08	0,26	0,32	0,7548	-0,75	1,08	-0,04	0,14	-0,26	0,7951	-0,57	0,42
	x ₁ x ₃	0,17	0,26	0,66	0,5177	-0,57	1,26	-0,03	0,14	-0,22	0,8279	-0,56	0,43
	x ₁ x ₄	-0,15	0,26	-0,59	0,5624	-1,23	0,61	-0,01	0,14	-0,05	0,9619	-0,51	0,48
	x ₂ x ₃	0,21	0,26	0,81	0,4283	-0,49	1,34	0,16	0,14	1,14	0,2728	-0,17	0,82
	x ₂ x ₄	0,03	0,26	0,13	0,8973	-0,85	0,99	-0,14	0,14	-0,98	0,3443	-0,77	0,22
	x ₃ x ₄	0,06	0,26	0,22	0,8297	-0,80	1,03	-0,10	0,14	-0,74	0,4712	-0,70	0,29

Apêndice E - Coeficiente de regressão das análises globais de DQOt e DQOs para os ensaios com efluente bacteriano e enzimático. CR=Coeficiente de Regressão. EP=Erro Padrão. LI=Limite Inferior. LS=Limite Superior.

Inóculo	Var	DQOt 0-72h						DQOs 0-72h					
		CR	EP	T	p	LI	LS	CR	EP	T	P	LI	LS
Bacteriano (MOV7)	Mean	-1,10	0,21	-5,25	0,0001	-1,46	-0,73	-0,72	0,12	-6,17	0,0000	-0,92	-0,51
	x ₁ (L)	-0,29	0,10	-2,76	0,0146	-0,94	-0,21	-0,01	0,06	-0,21	0,8364	-0,23	0,18
	x ₁ (Q)	0,21	0,10	2,15	0,0487	0,08	0,76	0,09	0,05	1,72	0,1069	0,00	0,38
	x ₂ (L)	-0,28	0,10	-2,66	0,0179	-0,92	-0,19	-0,02	0,06	-0,29	0,7763	-0,24	0,17
	x ₂ (Q)	-0,31	0,10	-3,21	0,0058	-0,97	-0,28	-0,08	0,05	-1,51	0,1508	-0,35	0,03
	x ₃ (L)	-0,14	0,10	-1,36	0,1951	-0,65	0,08	-0,07	0,06	-1,12	0,2798	-0,33	0,07
	x ₃ (Q)	-0,13	0,10	-1,34	0,1994	-0,60	0,08	-0,04	0,05	-0,80	0,4375	-0,28	0,10
	x ₄ (L)	-0,10	0,10	-0,93	0,3663	-0,56	0,17	0,03	0,06	0,47	0,6431	-0,15	0,26
	x ₄ (Q)	0,24	0,10	2,50	0,0246	0,15	0,83	0,26	0,05	4,79	0,0002	0,33	0,71
	x ₁ x ₂	0,00	0,13	-0,02	0,9814	-0,45	0,44	-0,07	0,07	-1,03	0,3197	-0,40	0,10
	x ₁ x ₃	0,14	0,13	1,14	0,2741	-0,16	0,74	0,01	0,07	0,17	0,8657	-0,22	0,27
	x ₁ x ₄	0,20	0,13	1,60	0,1303	-0,04	0,86	0,03	0,07	0,43	0,6740	-0,19	0,31
	x ₂ x ₃	-0,03	0,13	-0,24	0,8146	-0,51	0,39	0,03	0,07	0,46	0,6510	-0,18	0,32
	x ₂ x ₄	0,12	0,13	0,96	0,3544	-0,20	0,69	-0,09	0,07	-1,21	0,2443	-0,42	0,08
	x ₃ x ₄	0,08	0,13	0,66	0,5211	-0,28	0,62	0,06	0,07	0,85	0,4102	-0,13	0,37
	Enzimático (LPP)	Mean	-5,98	0,39	-15,23	0,0000	-6,67	-5,30	-5,20	0,28	-18,89	0,0000	-5,68
x ₁ (L)		0,10	0,20	0,49	0,6301	-0,50	0,88	0,18	0,14	1,29	0,2177	-0,13	0,84
x ₁ (Q)		0,38	0,18	2,09	0,0542	0,12	1,41	0,26	0,13	2,02	0,0619	0,07	0,97
x ₂ (L)		-1,48	0,20	-7,54	0,0000	-3,65	-2,27	-1,29	0,14	-9,38	0,0000	-3,06	-2,10
x ₂ (Q)		0,09	0,18	0,51	0,6163	-0,46	0,83	-0,02	0,13	-0,19	0,8535	-0,50	0,40
x ₃ (L)		-0,21	0,20	-1,07	0,3009	-1,11	0,27	-0,07	0,14	-0,51	0,6173	-0,62	0,34
x ₃ (Q)		0,19	0,18	1,02	0,3248	-0,27	1,02	0,16	0,13	1,22	0,2401	-0,14	0,77
x ₄ (L)		-0,18	0,20	-0,93	0,3663	-1,06	0,32	-0,14	0,14	-0,99	0,3375	-0,75	0,21
x ₄ (Q)		0,13	0,18	0,70	0,4931	-0,39	0,90	0,03	0,13	0,23	0,8234	-0,39	0,51
x ₁ x ₂		0,08	0,24	0,32	0,7509	-0,69	1,00	0,00	0,17	0,00	1,0000	-0,59	0,59
x ₁ x ₃		-0,02	0,24	-0,07	0,9453	-0,88	0,81	-0,08	0,17	-0,50	0,6256	-0,76	0,42
x ₁ x ₄		0,02	0,24	0,06	0,9503	-0,81	0,87	-0,18	0,17	-1,09	0,2943	-0,96	0,22
x ₂ x ₃		0,09	0,24	0,39	0,6998	-0,65	1,03	-0,04	0,17	-0,25	0,8033	-0,68	0,51
x ₂ x ₄		0,99	0,21	2,64	0,9116	0,21	1,89	-0,14	0,17	-0,81	0,4328	-0,86	0,32
x ₃ x ₄		1,20	0,21	3,22	0,9744	0,43	2,14	-0,03	0,17	-0,18	0,8587	-0,65	0,53

Apêndice F - Coeficiente de regressão das análises O&G e IA para os ensaios com efluente bacteriano e enzimático no período fermentativo. CR=Coeficiente de Regressão. EP=Erro Padrão. LI=Limite Inferior. LS=Limite Superior.

Inóculo	Var	Teor de O&G 0-48h						Índice de Acidez 0-48h					
		CR	EP	T	p	LI	LS	CR	EP	T	p	LI	LS
Bacteriano (MOV7)	Mean	-0,54	0,60	-0,89	0,3873	-1,60	0,52	-1,31	0,29	-4,55	0,0004	-1,82	-0,81
	x ₁ (L)	-0,60	0,30	-1,97	0,0673	-2,25	-0,13	0,91	0,14	6,34	0,0000	1,32	2,33
	x ₁ (Q)	0,06	0,28	0,21	0,8336	-0,87	1,11	0,66	0,13	4,87	0,0002	0,84	1,79
	x ₂ (L)	-0,04	0,30	-0,12	0,9068	-1,13	0,99	-0,12	0,14	-0,83	0,4221	-0,74	0,27
	x ₂ (Q)	0,00	0,28	0,02	0,9874	-0,98	1,00	0,26	0,13	1,94	0,0713	0,05	1,00
	x ₃ (L)	0,00	0,30	0,00	0,9968	-1,06	1,06	-0,25	0,14	-1,76	0,0982	-1,01	0,00
	x ₃ (Q)	1,22	0,28	4,31	0,0006	1,45	3,43	0,13	0,13	1,00	0,3352	-0,20	0,74
	x ₄ (L)	0,38	0,30	1,26	0,2270	-0,30	1,82	-0,04	0,14	-0,29	0,7787	-0,59	0,42
	x ₄ (Q)	0,06	0,28	0,23	0,8235	-0,86	1,12	0,26	0,13	1,92	0,0746	0,04	0,99
	x ₁ x ₂	-0,52	0,37	-1,41	0,1786	-2,34	0,25	-0,01	0,18	-0,05	0,9587	-0,64	0,60
	x ₁ x ₃	-0,46	0,37	-1,23	0,2365	-2,21	0,38	0,10	0,18	0,54	0,5946	-0,43	0,81
	x ₁ x ₄	0,33	0,37	0,89	0,3878	-0,64	1,95	0,32	0,18	1,81	0,0898	0,02	1,26
	x ₂ x ₃	-0,09	0,37	-0,24	0,8149	-1,47	1,12	0,06	0,18	0,34	0,7408	-0,50	0,74
	x ₂ x ₄	-0,27	0,37	-0,74	0,4703	-1,84	0,75	0,05	0,18	0,29	0,7780	-0,52	0,72
	x ₃ x ₄	0,07	0,37	0,20	0,8468	-1,15	1,44	0,11	0,18	0,63	0,5374	-0,40	0,84
Enzimático (LPP)	Mean	-1,40	0,28	-4,92	0,0002	-1,90	-0,90	2,45	1,77	1,38	0,1882	-0,66	5,55
	x ₁ (L)	-0,31	0,14	-2,15	0,0480	-1,11	-0,11	1,79	0,89	2,02	0,0613	0,48	6,70
	x ₁ (Q)	-0,01	0,13	-0,10	0,9190	-0,49	0,44	-0,41	0,83	-0,49	0,6301	-3,72	2,09
	x ₂ (L)	0,16	0,14	1,14	0,2726	-0,17	0,82	1,70	0,89	1,92	0,0747	0,29	6,51
	x ₂ (Q)	0,33	0,13	2,47	0,0262	0,19	1,12	0,14	0,83	0,16	0,8723	-2,64	3,18
	x ₃ (L)	0,10	0,14	0,71	0,4880	-0,30	0,70	-0,20	0,89	-0,22	0,8268	-3,50	2,71
	x ₃ (Q)	0,21	0,13	1,60	0,1296	-0,04	0,89	-0,27	0,83	-0,33	0,7453	-3,46	2,36
	x ₄ (L)	-0,08	0,14	-0,56	0,5833	-0,66	0,34	0,71	0,89	0,80	0,4341	-1,68	4,53
	x ₄ (Q)	0,41	0,13	3,09	0,0074	0,36	1,29	-0,25	0,83	-0,30	0,7667	-3,41	2,41
	x ₁ x ₂	-0,15	0,17	-0,86	0,4052	-0,91	0,31	2,23	1,09	2,05	0,0580	0,65	8,27
	x ₁ x ₃	0,00	0,17	0,00	0,9962	-0,61	0,61	-0,09	1,09	-0,08	0,9384	-3,98	3,64
	x ₁ x ₄	-0,09	0,17	-0,50	0,6227	-0,79	0,44	-1,67	1,09	-1,54	0,1441	-7,15	0,46
	x ₂ x ₃	0,02	0,17	0,11	0,9120	-0,57	0,65	1,62	1,09	1,49	0,1574	-0,58	7,04
	x ₂ x ₄	-0,20	0,17	-1,16	0,2641	-1,01	0,21	0,49	1,09	0,45	0,6578	-2,83	4,79
	x ₃ x ₄	-0,01	0,17	-0,06	0,9568	-0,63	0,59	-1,43	1,09	-1,31	0,2086	-6,66	0,95

Apêndice G - Coeficiente de regressão das análises O&G e IA para os ensaios com efluente bacteriano e enzimático no período aerado. CR=Coeficiente de Regressão. EP=Erro Padrão. LI=Limite Inferior. LS=Limite Superior.

Inóculo	Var	Teor de O&G 48-72h						Índice de Acidez 48-72h					
		CR	EP	T	p	LI	LS	CR	EP	T	p	LI	LS
Bacteriano (MOV7)	Mean	-0,51	0,64	-0,80	0,4387	-1,62	0,61	0,95	0,57	1,67	0,1147	-0,04	1,95
	x ₁ (L)	0,51	0,32	1,59	0,1317	-0,05	1,06	0,28	0,28	0,97	0,3474	-0,45	1,55
	x ₁ (Q)	0,10	0,30	0,32	0,7534	-0,43	0,62	0,40	0,27	1,49	0,1576	-0,14	1,73
	x ₂ (L)	-0,27	0,32	-0,85	0,4070	-0,83	0,29	0,18	0,28	0,63	0,5373	-0,64	1,36
	x ₂ (Q)	-0,09	0,30	-0,30	0,7649	-0,61	0,43	0,16	0,27	0,59	0,5614	-0,62	1,25
	x ₃ (L)	-0,01	0,32	-0,02	0,9842	-0,56	0,55	0,49	0,28	1,71	0,1085	-0,03	1,97
	x ₃ (Q)	-1,08	0,30	-3,62	0,0025	-1,60	-0,56	0,51	0,27	1,92	0,0746	0,09	1,95
	x ₄ (L)	-0,60	0,32	-1,89	0,0789	-1,16	-0,04	-0,14	0,28	-0,48	0,6389	-1,27	0,73
	x ₄ (Q)	0,49	0,30	1,64	0,1214	-0,03	1,01	0,11	0,27	0,42	0,6776	-0,71	1,16
	x ₁ x ₂	0,67	0,39	1,72	0,1068	-0,01	1,35	0,56	0,35	1,60	0,1294	-0,10	2,34
	x ₁ x ₃	0,38	0,39	0,96	0,3510	-0,31	1,06	0,51	0,35	1,46	0,1636	-0,20	2,24
	x ₁ x ₄	-0,10	0,39	-0,26	0,8009	-0,78	0,58	0,42	0,35	1,21	0,2435	-0,38	2,07
	x ₂ x ₃	-0,09	0,39	-0,23	0,8229	-0,77	0,59	-0,14	0,35	-0,39	0,7010	-1,49	0,95
	x ₂ x ₄	0,40	0,39	1,02	0,3252	-0,29	1,08	0,01	0,35	0,03	0,9746	-1,20	1,24
	x ₃ x ₄	-0,10	0,39	-0,25	0,8082	-0,78	0,59	-0,63	0,35	-1,82	0,0889	-2,49	-0,05
Enzimático (LPP)	Mean	-0,54	0,16	-3,46	0,0035	-0,81	-0,27	-12,36	1,64	-7,52	0,0000	-15,25	-9,48
	x ₁ (L)	0,19	0,08	2,38	0,0311	0,10	0,65	0,26	0,82	0,31	0,7594	-1,18	1,70
	x ₁ (Q)	0,14	0,07	1,91	0,0759	0,02	0,54	0,73	0,77	0,95	0,3588	-0,62	2,08
	x ₂ (L)	-0,49	0,08	-6,26	0,0000	-1,25	-0,70	-3,64	0,82	-4,43	0,0005	-5,08	-2,20
	x ₂ (Q)	-0,33	0,07	-4,49	0,0004	-0,91	-0,40	0,02	0,77	0,03	0,9759	-1,32	1,37
	x ₃ (L)	-0,07	0,08	-0,84	0,4119	-0,41	0,14	-0,90	0,82	-1,09	0,2925	-2,34	0,54
	x ₃ (Q)	0,07	0,07	1,01	0,3303	-0,11	0,40	0,50	0,77	0,65	0,5249	-0,85	1,85
	x ₄ (L)	0,09	0,08	1,10	0,2872	-0,10	0,45	-1,04	0,82	-1,27	0,2233	-2,49	0,40
	x ₄ (Q)	-0,14	0,07	-1,94	0,0714	-0,54	-0,03	0,34	0,77	0,44	0,6651	-1,01	1,69
	x ₁ x ₂	0,14	0,10	1,45	0,1684	-0,06	0,61	-1,21	1,01	-1,20	0,2497	-2,97	0,56
	x ₁ x ₃	0,07	0,10	0,73	0,4747	-0,20	0,48	0,19	1,01	0,19	0,8510	-1,57	1,96
	x ₁ x ₄	0,08	0,10	0,82	0,4224	-0,18	0,49	1,76	1,01	1,75	0,1011	-0,01	3,52
	x ₂ x ₃	0,04	0,10	0,37	0,7150	-0,26	0,41	-1,66	1,01	-1,65	0,1195	-3,43	0,10
	x ₂ x ₄	0,10	0,10	1,08	0,2965	-0,13	0,54	-0,36	1,01	-0,35	0,7278	-2,12	1,41
	x ₃ x ₄	0,04	0,10	0,42	0,6804	-0,26	0,42	2,02	1,01	2,00	0,0637	0,25	3,78

Apêndice H - Coeficiente de regressão das análises globais de O&G e IA para os ensaios com efluente bacteriano e enzimático. CR=Coeficiente de Regressão. EP=Erro Padrão. LI=Limite Inferior. LS=Limite Superior.

Inóculo	Var	Teor de O&G 0-72h						Índice de Acidez 0-72h					
		CR	EP	T	p	LI	LS	CR	EP	T(24)	p	LI	LS
Bacteriano (MOV7)	Mean	-1,04	0,20	-5,09	0,0001	-1,40	-0,68	-0,36	0,47	-0,76	0,4579	-1,18	0,47
	x ₁ (L)	-0,09	0,10	-0,86	0,4014	-0,54	0,18	1,19	0,23	5,07	0,0001	1,56	3,20
	x ₁ (Q)	0,16	0,10	1,62	0,1253	-0,02	0,65	1,05	0,22	4,79	0,0002	1,33	2,87
	x ₂ (L)	-0,31	0,10	-3,00	0,0090	-0,97	-0,26	0,06	0,23	0,26	0,7996	-0,70	0,94
	x ₂ (Q)	-0,09	0,10	-0,90	0,3833	-0,51	0,16	0,42	0,22	1,91	0,0753	0,07	1,61
	x ₃ (L)	-0,01	0,10	-0,05	0,9607	-0,37	0,35	0,23	0,23	0,99	0,3402	-0,36	1,29
	x ₃ (Q)	0,14	0,10	1,47	0,1630	-0,05	0,62	0,64	0,22	2,93	0,0103	0,52	2,06
	x ₄ (L)	-0,22	0,10	-2,14	0,0491	-0,80	-0,08	-0,18	0,23	-0,76	0,4614	-1,18	0,47
	x ₄ (Q)	0,55	0,10	5,77	0,0000	0,77	1,44	0,37	0,22	1,69	0,1118	-0,03	1,51
	x ₁ x ₂	0,15	0,13	1,17	0,2613	-0,15	0,73	0,55	0,29	1,91	0,0752	0,09	2,11
	x ₁ x ₃	-0,08	0,13	-0,65	0,5281	-0,60	0,28	0,61	0,29	2,11	0,0522	0,20	2,22
	x ₁ x ₄	0,23	0,13	1,82	0,0880	0,02	0,90	0,74	0,29	2,58	0,0207	0,48	2,50
	x ₂ x ₃	-0,18	0,13	-1,41	0,1790	-0,79	0,09	-0,08	0,29	-0,27	0,7928	-1,16	0,85
	x ₂ x ₄	0,12	0,13	0,97	0,3452	-0,20	0,68	0,06	0,29	0,22	0,8324	-0,88	1,13
	x ₃ x ₄	-0,02	0,13	-0,19	0,8537	-0,49	0,39	-0,52	0,29	-1,82	0,0893	-2,05	-0,04
Enzimático (LPP)	Mean	-1,94	0,25	-7,63	0,0000	-2,39	-1,49	-9,92	1,65	-6,01	0,0000	-12,81	-7,03
	x ₁ (L)	-0,12	0,13	-0,94	0,3598	-0,34	0,10	2,05	0,82	2,49	0,0252	1,21	6,99
	x ₁ (Q)	0,13	0,12	1,06	0,3075	-0,08	0,33	0,32	0,77	0,42	0,6839	-2,06	3,35
	x ₂ (L)	-0,33	0,13	-2,57	0,0213	-0,55	-0,10	-1,94	0,82	-2,35	0,0326	-6,77	-0,99
	x ₂ (Q)	0,00	0,12	0,00	0,9961	-0,21	0,21	0,16	0,77	0,21	0,8393	-2,39	3,02
	x ₃ (L)	0,04	0,13	0,28	0,7861	-0,19	0,26	-1,09	0,82	-1,33	0,2043	-5,08	0,70
	x ₃ (Q)	0,29	0,12	2,41	0,0291	0,08	0,50	0,23	0,77	0,29	0,7734	-2,25	3,16
	x ₄ (L)	0,01	0,13	0,05	0,9597	-0,22	0,23	-0,33	0,82	-0,40	0,6931	-3,55	2,23
	x ₄ (Q)	0,27	0,12	2,26	0,0388	0,06	0,48	0,09	0,77	0,12	0,9097	-2,53	2,88
	x ₁ x ₂	-0,01	0,16	-0,07	0,9465	-0,28	0,26	1,02	1,01	1,01	0,3271	-1,49	5,59
	x ₁ x ₃	0,07	0,16	0,45	0,6624	-0,20	0,34	0,11	1,01	0,11	0,9169	-3,33	3,76
	x ₁ x ₄	-0,01	0,16	-0,05	0,9570	-0,28	0,26	0,09	1,01	0,08	0,9336	-3,37	3,71
	x ₂ x ₃	0,06	0,16	0,35	0,7279	-0,22	0,33	-0,05	1,01	-0,05	0,9642	-3,63	3,45
	x ₂ x ₄	-0,10	0,16	-0,63	0,5365	-0,37	0,17	0,13	1,01	0,13	0,8964	-3,27	3,81
	x ₃ x ₄	0,03	0,16	0,20	0,8468	-0,24	0,30	0,59	1,01	0,58	0,5686	-2,36	4,72

Apêndice I - Tabela de ANOVA dos dados de DQOt, DQOs, O&G e IA para os ensaios com inóculo MOV7 e enzima

Variável	Inóculo	Fonte de Variação	SQ			GL			QM			Fcal		
			0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h	0-48h	48-72h	0-72h
DQOt	MOV7	Regressão	4,14	4,68	9,64	3	2	5	1,38	2,34	1,93	5,21	7,01	7,16
		Resíduos	6,89	9,02	6,46	26	27	24	0,26	0,33	0,27			
		Total	11,03	13,70	16,10	29	29	29						
	LPP	Regressão	19,63	67,54	55,92	6	4	2	3,27	16,89	27,96	9,82	20,21	42,75
		Resíduos	7,66	20,88	17,66	23	25	27	0,33	0,84	0,65			
		Total	27,29	88,42	73,58	29	29	29						
DQOs	MOV7	Regressão	1,93	2,88	2,01	2	6	1	0,96	0,48	2,01	9,67	8,93	25,61
		Resíduos	2,69	1,24	2,19	27	23	28	0,10	0,05	0,08			
		Total	4,62	4,11	4,20	29	29	29						
	LPP	Regressão	2,56	48,87	41,66	2	3	2	1,28	16,29	20,83	4,20	65,90	57,05
		Resíduos	8,24	6,43	9,86	27	26	27	0,31	0,25	0,37			
		Total	10,80	55,30	51,52	29	29	29						
O&G	MOV7	Regressão	50,29	45,60	12,33	2	2	4	25,15	22,80	3,08	14,34	9,61	11,59
		Resíduos	47,35	64,04	6,65	27	27	25	1,75	2,37	0,27			
		Total	97,64	109,64	18,98	29	29	29						
	LPP	Regressão	9,10	10,90	6,49	3	5	3	3,03	2,18	2,16	7,34	15,69	8,11
		Resíduos	10,75	3,33	6,94	26	24	26	0,41	0,14	0,27			
		Total	19,85	14,24	13,43	29	29	29						
IA	MOV7	Regressão	37,88	6,43	99,48	6	1	8	6,31	6,43	12,43	16,50	2,99	10,07
		Resíduos	8,80	60,32	25,93	23	28	21	0,38	2,15	1,23			
		Total	46,68	66,75	125,40	29	29	29						
	Enzima LPP	Regressão	225,92	382,88	191,25	3	2	2	75,31	191,44	95,63	4,58	12,00	8,52
		Resíduos	427,64	430,59	303,06	26	27	27	16,45	15,95	11,22			
		Total	653,56	813,47	494,32	29	29	29						

Apêndice J - Tabela de efeito das variáveis estatisticamente significantes dos diferentes ensaios. F: Período fermentativo; A: período aerado; G: global. T: temperatura; CI: concentração do inóculo; DE: diluição do efluente

Inóculo	Respostas		x_1	x_1^2	x_2	x_2^2	x_3	x_3^2	x_4	x_4^2	$x_1 \cdot x_2$	$x_1 \cdot x_3$	$x_1 \cdot x_4$	$x_2 \cdot x_3$	$x_2 \cdot x_4$	$x_3 \cdot x_4$	R^2	F_{calc}	F_{tab}	
		Int	T(L)	T(Q)	CI(L)	CI(Q)	DE(L)	DE(Q)	pH(L)	pH(Q)	T.CI	T.DE	T.pH	CI.DE	CI.pH	DE.pH				
MOV7	DQOt	F	-0,48		0,21					0,26						0,28	0,37	5,21	2,31	
		A	-0,77							-0,36				0,32				0,34	7,01	2,51
		G	-1,25	-0,29	0,23	-0,28	-0,29				0,26							0,62	7,16	2,1
	DQOs	F	-0,39		0,21						0,17							0,42	9,67	2,51
		A	-0,20		-0,13			-0,10	-0,14	-0,09	-0,14	0,19						0,72	8,9	2,05
		G	-0,74								0,26							0,48	25,6	2,89
	O&G	F		-0,60							1,20							0,52	14,3	2,51
		A							-1,13	-0,60								0,42	9,6	2,51
		G	-0,86			-0,31				-0,22	0,53			0,23				0,65	11,6	2,18
	IA	F	-1,16	0,91	0,64		0,24	-0,25			0,24			0,32				0,80	16,5	2,05
		A	1,89														-0,63	0,10	2,98	2,89
		G	0,07	1,19	1,00		0,37		0,59			0,55	0,61	0,74			-0,52	0,78	10,1	1,98
Enzima LPP	DQOt	F	-2,02		-0,35		0,50	0,32	0,34	-0,34	0,21						0,73	9,2	2,05	
		A	-4,20		0,76	-1,30	-0,37	-0,53										0,77	20,2	2,18
		G	-5,62		0,34	-1,48												0,76	42,7	2,51
	DQOs	F	-1,94	0,22				0,22										0,23	4,2	2,51
		A	-3,25		0,44	-1,32	-0,24											0,88	65,9	2,31
		G	-5,05		0,24	-1,29												0,81	57,0	2,51
	O&G	F	-1,20	-0,31			0,30				0,39							0,44	7,3	2,31
		A	-0,46	0,19	0,13	-0,49	-0,34				-0,15							0,77	15,7	2,10
		G	-1,81			-0,33			0,27		0,25							0,47	8,1	2,31
	IA	F	1,81	1,80		1,70						2,23						0,35	4,6	2,31
		A	-11,1			-3,64											2,02	0,47	12,0	2,51
		G	-9,28	2,05		-1,94												0,38	8,5	2,51

$$\text{Respostas} = \text{intercepção} + x_1 + x_1^2 + x_2 + x_2^2 + x_3 + x_3^2 + x_4 + x_4^2 + x_1 \cdot x_2 + x_1 \cdot x_3 + x_1 \cdot x_4 + x_2 \cdot x_3 + x_2 \cdot x_4 + x_3 \cdot x_4$$