

**MAIARA FONSECA DIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE  
LATICÍNIOS TRATADOS COM LIPASES MICROBIANAS**

**RIO POMBA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016**

**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Jofre Moreira – IFET/RP**  
**Bibliotecária: Ana Carolina Souza Dutra CRB 6 / 2977**

D541c      Dias, Maiara Fonseca.

Caracterização de efluentes de indústrias de laticínios tratados com lipases microbianas./ Maiara Fonseca Dias. – Rio Pomba, 2016.  
ix., 37f. : il.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Larissa Mattos Trevizano.

Trabalho de Conclusão de Curso - Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba.

1. Laticínios. 2. Tratamento de efluentes. 3. Microbiologia. I. Trevizano, Larissa Mattos. II. Título.

CDD: 637.1

**MAIARA FONSECA DIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE  
LATICÍNIOS TRATADOS COM LIPASES MICROBIANAS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao *Campus* Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como parte das exigências do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientadora: Prof<sup>(a)</sup> LARISSA MATTOS TREVIZANO

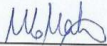
**RIO POMBA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016**

**MAIARA FONSECA DIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE  
LATICÍNIOS TRATADOS COM LIPASES MICROBIANAS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao *Campus*  
Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação  
Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas  
Gerais, como parte das exigências do curso de  
Ciência e Tecnologia de Alimentos para a  
obtenção do título de Bacharel em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos

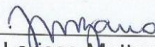
APROVADA: 08/12/2016



Prof. Maurílio Lopes Martins  
Coorientador e Membro da Banca



Prof. Roselir Ribeiro da Silva  
Coorientador e Membro da Banca



Prof.<sup>a</sup> Larissa Mattos Trevisano  
(Orientador e Presidente da Banca Examinadora)

Dedico este trabalho à memória de  
minha mãe.

Eterno exemplo de determinação,  
bondade e doçura.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me guiado em todas as etapas do desenvolvimento desse trabalho e por ter me dado forças, sabedoria, determinação e graça para chegar até aqui, pois só ele sabe o quanto foi árdua a caminhada.

À minha querida orientadora, Larissa Mattos Trevizano, pela confiança, orientação, compreensão, paciência, conselhos, incentivo, apoio, dedicação, ensinamentos e por ser um grande exemplo profissional e pessoal.

Aos coorientadores, Maurílio Lopes Martins e Roselir Ribeiro da Silva pelos ensinamentos, ajuda e preocupação com os resultados do trabalho.

Aos meus queridos pais Niciléia *“in memoriam”* e Sebastião pelo carinho, paciência, compreensão e apoio que me deram, desde os primeiros passos de minha vida.

A todos os meus familiares, em especial ao meu irmão, Bruno, minha avó “Terninha” e ao meu tio Ronaldo pelo carinho, estímulo e apoio.

Ao meu amor, amigo e companheiro, Bruno Araújo, pelo grande incentivo para que eu chegasse até aqui, pelo seu amor e apoio nas etapas finais deste trabalho.

Agradeço a todos os professores, ministrantes das aulas do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos transferidos.

Agradeço aos técnicos de laboratório, Jhonatan, Renata, Patrícia, Rosélio e Mauro pela paciência, ajuda e ensinamentos práticos.

À Paula pela amizade, apoio e cumplicidade porque mesmo distante, estava presente em minha vida.

Aos meus amigos, colegas e companheiros de caminhada do curso, em especial à Daniela, Jessica, Mateus, Marlon, Vinicius, John e Dairo, que fizeram desta jornada mais gostosa e agradável. Juntos conseguimos passar por todas as dificuldades. Vou sentir imensas saudades de todos os momentos que passamos juntos.

Aos funcionários do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, *Campus* Rio Pomba.

Ao Laticínios Lindo Vale que forneceu amostras de leite e o efluente, e ao Departamento de Zootecnia que disponibilizou o laboratório e reagentes para o desenvolvimento do projeto.

Obrigada a todos que, mesmo não citados aqui, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa e para a Maiara que sou hoje.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin (1889– 1977).

# **Ciência e Tecnologia de Alimentos**

## **CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS TRATADOS COM LIPASES MICROBIANAS**

### **RESUMO**

**Maiara Fonseca Dias**

**Dezembro, 2016**

**Orientadora:** Professora Larissa Mattos Trevizano

Lipases são hidrolases que catalisam a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. Estas enzimas são utilizadas em diversos setores industriais alimentícios, sendo um deles no tratamento de efluentes ricos em lipídios. Muitas indústrias não possuem tecnologia para o tratamento de efluentes e tornam-se responsáveis pela produção de resíduos com alta carga orgânica que são despejados no meio ambiente, contribuindo com a poluição hídrica. Assim, o presente trabalho objetivou desenvolver uma metodologia alternativa, através do pré-tratamento enzimático utilizando lipases microbianas, para a redução da carga lipolítica de efluentes gerados em indústria de laticínios. Lipases bacterianas foram avaliadas quanto à termoestabilidade, atuação durante o pré-tratamento na redução da carga orgânica e redução da demanda bioquímica de oxigênio. Constatou-se que, nos testes iniciais, as lipases provenientes de bactérias isoladas de leite cru (extrato enzimático 1) permaneceram ativas até 24 h quando pré-incubadas a 40 °C e possibilitaram a produção efetiva de ácidos graxos livres até 12 h de pré-tratamento enzimático. Já as lipases obtidas de bactérias isoladas de contaminação natural de placa de Petri (extrato enzimático 2) mantiveram-se ativas por 2 h quando pré-incubadas a 50 °C e até 24 h no ensaio de pré-incubação a 40°C, no qual possibilitaram produção efetiva de ácidos graxos até 12 h de pré-tratamento. Na avaliação final do pré-tratamento enzimático utilizando a lipase 1, confirmou-se a manutenção da atividade enzimática até 12 h a 40 °C e que a produção efetiva de ácidos graxos livres foi iniciada a partir de 4h de pré-tratamento, reduzindo a DBO em 6,6%.

**Palavras-chave:** laticínios, lipases, pré-tratamento enzimático.



# **“Food Science and Technology**

## **CHARACTERIZATION OF INDUSTRIES EFFLUENTS TREATED WITH MICROBIAL LIPASES**

### **ABSTRACT**

**Maiara Fonseca Dias**

**December, 2016**

**Adviser:** Larissa Mattos Trevizano

Lipases are hydrolases that catalyze the triacylglycerol conversion to free fatty acids and glycerol. These enzymes are used in several industrial food sectors including the lipids effluents treatment. Many industries do not have technology for the effluents treatment. Thus, they become responsible for the production of high organic wastes that are discarded in the environment, contributing to water pollution. The present work aimed the alternative methodology development to reduce the lipolytic load of effluents generated in the dairy industry. This methodology was based on enzymatic pretreatment of effluents using microbial lipases. Bacterial lipases thermostability, their performance during pretreatment and the biochemical oxygen demand reduction were evaluated. The initial tests, using lipases from raw milk bacteria (enzymatic extract 1), exhibited that the lipases remained active up to 24 h when pre-incubated at 40 °C and that they allowed effective production of free fatty acids up to 12 h of enzymatic pretreatment. On the other hand, lipases obtained from bacteria isolated from petri dish natural contamination (enzymatic extract 2) remained active for 2 h when preincubated at 50 °C. Lipase 2 remained active up to 24 h in the 40 °C pre-incubation test, allowing fatty acids production up to 12 h of pretreatment. The enzymatic pretreatment final evaluation using lipase 1 emphasized the enzymatic activity maintenance up to 12 h at 40 °C and that the effective production of free fatty acids was started from 4 h of pretreatment allowing a 6.6% biochemical oxygen demand reduction.

**Keywords:** enzymatic pretreatment, food company, lipases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Hidrólise sequencial dos grupos acila do glicerídeo catalisada por lipases.....	3
<b>Figura 2:</b> Curva de calibração para a demanda química de oxigênio (DQO) em mg O <sub>2</sub> /L.....	15
<b>Figura 3:</b> Halos de hidrólise ao redor do isolado produtor de lipase obtido de leite cru.....	16
<b>Figura 4:</b> Resultado da coloração de Gram da bactéria lipolítica isolada do leite cru.....	17
<b>Figura 5:</b> Média do teor de ácidos graxos livres ao longo do tratamento enzimático do efluente. A – pré-tratamento realizado com o extrato enzimático 1. B – pré- tratamento realizado com o extrato enzimático 2. Barras em preto indicam a média do controle e barras em cinza indicam a média dos tratamentos enzimáticos.....	19
<b>Figura 6:</b> Estabilidade térmica do extrato enzimático 1 a 40°C.....	22
<b>Figura 7:</b> Média do teor de ácidos graxos livres ao longo do tratamento enzimático do efluente. Barras em preto indicam a média do controle e barras em cinza indicam a média dos tratamentos enzimáticos.....	23
<b>Figura 8:</b> Média do teor de ácidos graxos livres ao longo do tratamento enzimático descontando-se o controle em cada tempo.....	24
<b>Figura 9:</b> Média de DBO (mg O <sub>2</sub> /L) nos diferentes tempos do pré-tratamento (controle e tratamento) .....	25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição do meio mínimo.....	1
<b>Tabela 2:</b> Composição do meio de cultura .....	11
<b>Tabela 3:</b> Estabilidade térmica dos extratos a 40 °C.....	18
<b>Tabela 4:</b> Resultados das análises físico-químicas dos soros A e B (média ± desvio padrão) .....	21
<b>Tabela 5:</b> Estabilidade térmica do extrato enzimático 1 a 40°C.....	22
<b>Tabela 6:</b> Média de DBO (mg O <sub>2</sub> /L) nos diferentes tempos do pré-tratamento (controle e tratamento) .....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
PCA	<i>Plate Count Ágar</i> – Ágar Padrão para Contagem

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>EPIGRAFE</b> .....	iv
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Enzimas.....	2
2.2 Lipases.....	2
2.3 Efluentes Gerados pelas Indústrias de Laticínios e Legislação Ambiental.....	4
2.4 Tratamento de Efluentes Utilizando Lipases.....	6
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	9
3.1 Objetivo Geral.....	9
3.2 Objetivos Específicos.....	9
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	9
4.1 Obtenção e Isolamento dos Microrganismos Lipolíticos.....	9
4.2 Caracterização dos Microrganismos.....	10
4.3 Ativação dos Microrganismo.....	10
4.4 Cultivo do Microrganismo e Indução da Produção de Lipases.....	11
4.5 Obtenção do Extrato Enzimático.....	11
4.6 Termoestabilidade e Ensaio Enzimático.....	11
4.7 Coleta do Efluente.....	12
4.7.1 Caracterização do Efluente.....	13

4.8 Pré-Tratamento Enzimático do Efluente.....	13
4.9 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) .....	14
4.10 Demanda Química de Oxigênio (DQO) .....	14
4.11 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	15
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>15</b>
5.1 Obtenção e Isolamento dos Microrganismos Lipolíticos.....	15
5.2 Caracterização dos Microrganismos.....	16
5.3 Ensaio Preliminares.....	17
5.3.1 Termoestabilidade Enzimática.....	17
5.3.2 Pré-Tratamento Enzimático do Efluente.....	18
5.4 Avaliação do Pré-Tratamento Enzimático Utilizando o Extrato Enzimático 1.....	20
5.4.1 Caracterização do Efluente.....	20
5.4.2 Termoestabilidade Enzimática.....	21
5.4.3 Pré-Tratamento Enzimático do Efluente.....	23
5.4.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) .....	24
5.4.5 Demanda Química de Oxigênio (DQO) .....	27
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As indústrias alimentícias, incluindo os laticínios, são economicamente importantes e por isso, são consideradas um setor de grande relevância industrial. Porém, muitas destas indústrias contribuem significativamente para a poluição hídrica, uma vez que um grande número dessas lançam seus efluentes nos cursos de água, aumentando a carga orgânica e, conseqüentemente, causando um maior impacto ambiental devido ao não tratamento destes efluentes (SILVA, 2011a).

Os efluentes, ricos em matéria orgânica, são os principais responsáveis pelas alterações nos parâmetros de controle ambiental como pH, sólidos totais, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), entre outros (PEREIRA, 2004). Os lipídeos presentes, além de representarem uma perda industrial importante, interferem negativamente nos Sistemas de Tratamento de Efluentes (ETE) (DORS, 2006).

O despejo de resíduos da indústria de laticínios, principalmente, nos cursos de água, ocorre de forma criminosa no Brasil, mesmo havendo uma legislação rígida, há ainda um descaso das autoridades competentes. Sendo assim, as lipases surgem como uma excelente alternativa para o tratamento do rejeito industrial composto por material graxo, visto que os efluentes industriais gerados em indústrias de alimentos, em geral, possuem elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO) (GASPARIN *et al.*, 2012).

As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas dos acilglicerois, liberando glicerol e ácidos graxos livres (BON, FERRARA e CORVO, 2008; MORAES, 2014). As enzimas apresentam muitas propriedades que ampliam o seu potencial de aplicação como catalisadores em processos industriais, o que possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos mais eficientes (GHOTRA, DYAL e NARINE, 2002). Dentre elas, destacam-se a grande disponibilidade e baixo custo, pois não requerem co-fatores, atuação em uma ampla faixa de pH e temperatura, nas quais são muito estáveis e apresentam elevada especificidade (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

Porém, os usos das lipases para tais fins estão em número bastante reduzido. A sua plena utilização necessita da redução dos custos dos processos de produção e purificação, da busca por novas cepas produtoras, do melhoramento genético destas

culturas, além da modificação química das lipases a fim de que produzam maiores quantidades de enzimas em tempos menores, com as características almejadas (PINHEIRO, 2006).

A caracterização dos efluentes deve ser considerada uma tarefa básica e indispensável, a fim de que o problema de tratamento seja adequadamente solucionado, através da obtenção de informações e de como esses são obtidos, para a adoção de métodos físicos, químicos e biológicos inerentes a sua composição e vazão (PEREIRA, FURIGO e CASTRO, 2004).

Dessa forma, existe um grande interesse no tratamento enzimático de efluentes com alto teor de lipídeos visando à implementação de uma tecnologia limpa e menos poluidora.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Enzimas**

As enzimas são proteínas com atividade catalítica que atuam acelerando reações entre os componentes químicos. Elas estão presentes em todos os sistemas biológicos e são produzidas por todos os organismos vivos (CANTO e MENEZES, 1995). As enzimas são o principal alvo de pesquisas em biotecnologia, não apenas por seu papel fundamental nos mecanismos celulares, mas também por sua capacidade de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (SENA *et al.*, 2006).

Estas biomoléculas apresentam muitas propriedades que ampliam o seu potencial de aplicação como catalisadores em processos industriais. Dentre estes aspectos vantajosos, estão: a alta eficiência catalítica, que é responsável por aumentar a velocidade de uma reação de  $10^8$  a  $10^{12}$  vezes; a alta seletividade; a atuação em condições brandas de temperatura, na faixa de 30 a 70 °C e a atuação em pressão atmosférica (RAMANI *et al.*, 2010).

### **2.2 Lipases**

Lipases (triacilglicerol ester hidrolases, E.C. 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas dos acilglicerois, liberando glicerol e ácidos graxos livres (CASTRO *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2005; BOM, FERRARA e CORVO, 2008; MORAES, 2014). Elas são comumente encontradas na natureza,



podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (FREIRE e CASTILHO, 2008; ADRIO e DEMAÏN, 2014).

Uma das principais reações catalisadas pelas lipases é a de hidrólise (Figura 1), onde ocorre a quebra das ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água e liberação de ácidos graxos livres (YAHYA, ANDERSON e MOO-YONG, 1998).

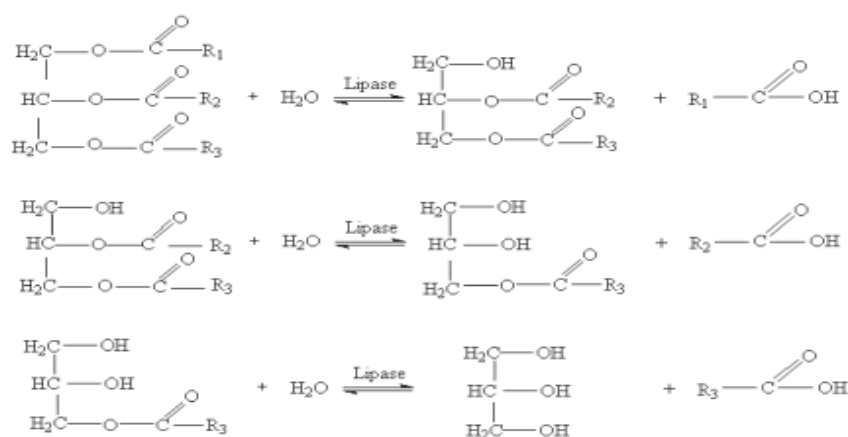


Figura 1: Hidrólise sequencial dos grupos acila do glicerídeo catalisada por lipases. Adaptada de Haraldsson (1991).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando de 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa de 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C (COELHO *et al.*, 2001). Lipases apresentam, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C, contudo sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (VULFSON, 1994; CARVALHO *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004). As lipases microbianas são, em sua maioria, extracelulares, o que facilita a extração e purificação (CARVALHO *et al.*, 2003).

A maioria das lipases utilizadas industrialmente são de origem microbiana, uma vez que estas apresentam muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção; a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais; oferecem amplo espectro de características físico-químicas; possuem alta versatilidade em suas propriedades; facilidade na produção em massa e, são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade ao substrato, o que as tornam muito atrativas para a aplicação industrial (ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA, 2010). Além de serem

estáveis à temperatura e ao pH (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010) e ativas em meio aquoso e não aquoso (GUTARRA *et al.*, 2009).

Novas aplicações para as lipases vêm sendo estabelecidas nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; CERNIA *et al.*, 2002; PRIYA e CHADHA, 2003), química fina (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; REETZ, 2002), cosméticos (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001), oleoquímica (REETZ, 2002), couros (TELES, CABRAL e SANTOS, 2001), polpa de celulose e papel (SHARMA *et al.*, 2001) e no tratamento de resíduos industriais (LEAL *et al.*, 2002), como, por exemplo, na decomposição e remoção de substâncias oleosas na limpeza de tubulação e tratamento de efluentes.

A aplicação de lipases tem sido também preconizada na degradação biológica e remoção da carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos, laticínios e indústrias de alimentos em geral. Estas indústrias produzem um elevado teor de resíduos líquidos e sólidos que prejudicam as unidades industriais (KUSHWAHA SRIVASTAVA e MALL, 2010; SILVA, 2011a). Além disso, esses resíduos contêm elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica (CASTRO *et al.*, 2004; GASPARIN *et al.*, 2012).

### **2.3 Efluentes Gerados pelas Indústrias de Laticínios e Legislação Ambiental**

As indústrias de laticínios são economicamente importantes e por isso, são classificadas como um setor de destaque na indústria alimentícia. Como exemplo, segundo estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a produção de leite foi de 35,00 bilhões de litros, representando uma retração de 0,4% em relação ao ano anterior. Minas Gerais é o principal Estado produtor de leite do país, com 9,14 bilhões de litros, registrando uma queda de 2,4% em relação a 2014 (IBGE, 2015).

Porém, muitas destas indústrias contribuem significativamente para a poluição hídrica, uma vez que um grande número destas lançam seus efluentes nos cursos de água, aumentando assim a carga orgânica, sem nenhum tipo de tratamento (SILVA, 2011a). O que torna este cenário ainda mais preocupante é que cerca de 90 % dos laticínios em funcionamento são de pequeno e médio portes, e que muitas vezes não possuem pessoal qualificado para operar sistemas de tratamento de efluentes (MACHADO *et al.*, 1999).

O grande volume de água necessário para produção de produtos lácteos coloca a indústria de laticínios como uma das principais geradoras de efluentes, visto que na produção de 1 kg de queijo têm-se uma produção média de 9 litros de soro (BALDASSO, BARROS e TESSARO, 2011).

O soro de leite é um subproduto da indústria de laticínios, representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação de queijos ou da caseína. É um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeada (GUIMARÃES, TEIXEIRA e DOMINGUES, 2010). Cerca de 85 a 95% de todo o leite é o soro, o qual contém, após separação da caseína, 55% dos nutrientes do leite. Dentre estes nutrientes, pode-se destacar a lactose (4,8%); as proteínas solúveis (0,75%) ricas em aminoácidos essenciais; lipídeos (0,5%) e sais minerais (8 a 10%). Além destes componentes, o soro também apresenta ácido láctico e ácido cítrico, ureia e ácido úrico, vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 piridoxina, B5 e B12), além de ácido pantotênico, ácido fólico e biotina (KROLOW, 2013).

Sendo assim, como relatado, um dos principais problemas do soro é seu alto poder poluente devido à alta quantidade de substâncias orgânicas, representadas, principalmente, pelos carboidratos, lipídios e proteínas. A carga poluente, representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), varia entre 25.000 a 120.000 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que nele está contida, aproximadamente, metade dos sólidos de leite integral (FEAM, 2003). Esta carga poluente é cerca de 100 vezes maior que a de um esgoto doméstico. Uma fábrica com produção média de 300.000 litros de soro por dia, por exemplo, polui o equivalente a uma cidade com 150.000 habitantes (SILVA, 2011b). Quando descartado diretamente no solo, que constitui prática incorreta, compromete sua estrutura físico-química e diminui o rendimento da colheita (PORTO, SANTOS e MIRANDA 2005).

As condições de lançamento de efluentes de indústria de alimentos em Minas Gerais são determinadas pela Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº 01, de 05 de maio de 2008, no qual estabeleceu as seguintes condições de lançamento para efluentes em corpos hídricos: pH entre 6 e 9; temperatura inferior a 40 °C, sendo que a temperatura do corpo hídrico receptor não deverá exceder 3 °C na zona de mistura; concentração de óleo mineral até 20 mg/L e, para óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L; DBO até 60 mg/L ou tratamento com eficiência de redução de DBO em, no mínimo, 60%; DQO até 180 mg/L ou tratamento com eficiência de redução de DQO em, no mínimo, 55% (MINAS GERAIS, 2008).

## 2.4 Tratamento de Efluentes Utilizando Lipases

Segundo Andrade (2011), o tratamento convencional de efluentes de indústria de laticínios envolve o uso de quatro tipos de tratamento: preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar objetiva apenas a retirada de sólidos grosseiros, enquanto o primário visa à remoção de sólidos, óleos e gorduras presentes no efluente. No tratamento secundário predominam mecanismos biológicos para a retirada de matéria orgânica e nutrientes, como o nitrogênio e fósforo. E em alguns poucos casos, ocorre o tratamento terciário como forma de polimento.

Nos sistemas aeróbios, o alto teor de gordura afeta principalmente a eficiência de transferência de oxigênio, dificultando as trocas gasosas no tanque de aeração e ocasionando o desenvolvimento de bactérias filamentosas que dificultam a sedimentação do lodo e reduzem o desempenho do sistema em termos de redução de matéria orgânica (CAMMAROTA e FREIRE, 2006). Neste contexto, processos alternativos, como o tratamento enzimático com lipases, que visam à diminuição da carga de gorduras de efluentes são de extremo interesse para a indústria (MENDES, PEREIRA e CASTRO, 2006; TREICHEL *et al.*, 2010). Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (LEAL *et al.*, 2006).

O tratamento enzimático consiste em tratar previamente o efluente com uma preparação enzimática. O efluente pré-tratado segue então para a ETE (Estação de Tratamento de Efluentes) com uma menor carga orgânica, diminuindo assim o tempo de retenção hidráulica, o volume dos reatores e, conseqüentemente, os custos do processo (LEAL *et al.*, 2002).

Diante das necessidades e tendências da substituição das diversas etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes e da alteração de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis, prevê-se aumento significativo da utilização de enzimas (POLITZER e BON, 2006). Entre os processos de maior interesse industrial estão: as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos utilizando as lipases. Estas enzimas apresentam grande potencial biotecnológico porque apresentam alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerem a presença de cofatores e possuem grande especificidade pelo substrato (VULFSON, 1994).

O uso de lipases em tratamento de efluentes também fornece várias vantagens potenciais, entre as quais destacam-se: a simplicidade e a facilidade no controle do processo; aplicação em processos com baixa ou alta concentração de poluentes; operação em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade (CASTRO *et al.*, 2004). Além disso, não há necessidade de utilização de enzimas puras para este procedimento, o que significa processos mais baratos e também significa economia de tempo. A presença de outras enzimas, como as proteases e amilases, podem ser benéficas ao processo, já que os efluentes das indústrias de laticínios contêm, além de lipídeos, elevados teores de proteínas provenientes do leite (caseína) e carboidratos como amido, utilizado na preparação de doces à base de leite e iogurtes (RIGO *et al.*, 2008; BRÍGIDA *et al.*, 2013). Além disso, Fickers *et al.* (2006), demonstraram que a adição de proteínas, como albumina e caseína, afetou positivamente a atividade de lipase, pois estas moléculas podem formar interações de hidrogênio com a lipase e podem facilitar a interação com substratos hidrofóbicos na interface lipídeo-água.

Os tratamentos utilizando lipases termotolerantes têm sido estudados a fim de superar os problemas decorrentes da elevada concentração de gorduras nos efluentes de laticínios. Em elevadas temperaturas, as substâncias hidrofóbicas se tornam mais acessíveis aos microrganismos e à ação das enzimas lipolíticas, uma vez que os coeficientes de difusão e a solubilidade dos óleos e graxas se elevam com a temperatura, permitindo transferências de massa mais efetivas entre a fase líquida e os flocos biológicos (THOMAS, 1987 *apud* CAMMAROTA e FREIRE, 2006).

Para a aplicação de lipases no pré-tratamento de efluentes, é preferencial optar-se por enzimas microbianas obtidas de extratos brutos ao invés de enzimas comerciais (SILVA *et al.*, 2013b). Essa propensão deve-se ao fato de que os extratos brutos podem representar uma redução significativa dos custos de obtenção das enzimas, ampliando o uso industrial das mesmas (ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA 2010).

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a adsorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade adsorvida, acarretando em velocidades de hidrólise mais elevadas (MENDES *et al.*, 2005). Emulsificantes são descritos como importantes para as reações de hidrólise usando lipases já que é uma substância que tem afinidade tanto por substâncias polares

quanto por apolares e permite a dispersão de substâncias como lipídeos em água (VULFSON, 1994). A atividade das lipases varia em função do tipo do tensoativo, como da sua concentração, sendo a goma arábica e o Triton X-100 os emulsificantes mais utilizados nas análises da ação lipolítica sobre os triglicerídeos (ROCHA, 2000). Os biosurfactantes também podem ser usados para melhorar a interação água/óleo, podendo emulsionar triglicéridos, e assim, facilitar a ação das enzimas e o processo de biodegradação, eliminando a necessidade de processos adicionais de pré-tratamento para remover gorduras, permitindo processos operacionais de custos mais baixos (DAMASCENO, CAMMAROTA e FREIRE, 2012).

Para a utilização de enzimas no tratamento de efluentes, alguns critérios devem ser seguidos, antes de sua aplicação, como por exemplo: os produtos gerados pela reação devem ser de menor toxicidade e mais biodegradáveis, sendo assim, mais facilmente removidos por tratamentos subsequentes; a enzima deve ser capaz de catalisar seletivamente a degradação do composto alvo no efluente; deve ser ativa e estável nas condições de tratamento; os reatores devem ser simples e as enzimas obtidas devem ter o menor custo possível (AITKEN *et al.*, 1994).

A avaliação do desempenho destes processos é normalmente monitorada pela quantificação de ácidos graxos liberados durante a hidrólise utilizando o método de titulação (LEAL, 2000); e pela medição da remoção da matéria orgânica, através das análises de DBO e DQO. A DBO mede a quantidade de oxigênio necessária para que os microrganismos degradem a matéria orgânica e a DQO é a medida da quantidade de oxigênio necessária para oxidar quimicamente toda a matéria orgânica (VON SPERLING, 1997).

Considerando o processo completo de tratamento de efluentes, Silva *et al.* (2013a) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* AN400 na remoção de matéria orgânica de efluente sintético de laticínio, alcançando o percentual de remoção máximo de 71,7% para DQO. Vilela (2012) utilizou linhagens de *Cunninghamella elegans* URM6017 e URM5780 que apresentaram alto potencial para tratar efluente sólido da indústria de sorvete, havendo uma redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em 93,69% e da demanda química de oxigênio (DQO) em 95,54%, após o 17º dia de tratamento enzimático. Reis *et al.* (2015), isolaram o fungo *Aspergillus parasiticus* (SIS 16) do solo da Caatinga do Estado de Pernambuco, o qual demonstrou um elevado potencial biotecnológico para tratamentos de efluentes gordurosos de

indústrias lácteas, convertendo o conteúdo do resíduo rico em lipídeos em biomassa com uma porcentagem de 67,81% de lipídeos totais.

Sendo assim, observa-se que o tratamento de efluentes é um assunto de grande relevância e que o pré-tratamento enzimático utilizando lipases apresenta grande potencial para redução da carga lipolítica destes materiais contribuindo para a redução ambiental dos cursos de água e solos. Porém, para viabilizar economicamente este tipo de tratamento, é necessário conhecer detalhadamente os processos industriais responsáveis pela produção dos efluentes, como as variações ao longo do dia e semana; os insumos empregados; regime de descarga dos efluentes; procedimento para a limpeza das instalações; a frequência e produtos utilizados para esse fim, entre outros. Bem como, o uso de preparações enzimáticas ativas e otimização das condições adequadas de hidrólise (LEAL, 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar efluentes das indústrias de laticínios tratados com lipases para avaliação da eficiência do pré-tratamento enzimático na redução da carga lipolítica e aumento da produção de ácidos graxos livres.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Isolar microrganismos lipolíticos provenientes do meio ambiente;
- Determinar a termoestabilidade enzimática;
- Caracterizar o efluente;
- Realizar o pré-tratamento enzimático do efluente;
- Avaliar a eficiência do pré-tratamento por meio da análise do potencial de hidrólise e também, das análises de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO).

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Obtenção e Isolamento dos Microrganismos Lipolíticos**

Um microrganismo foi isolado de amostras de leite cru (amostra 1) provenientes do Laticínios Lindo Vale do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais (IF Sudeste MG) – *Campus* Rio Pomba. Uma outra cultura bacteriana, com potencial lipolítico, foi obtida de placas contendo meio PCA (*Plate Count Ágar*) (KASVI, ITÁLIA), adicionado

de tributirina (Himedia, Índia), naturalmente contaminadas que estavam sob refrigeração (amostra 2).

Para o isolamento das colônias lipolíticas, os isolados inicialmente selecionados foram coletados e transferidos para novas placas contendo meio PCA, adicionado de tributirina, e estas foram incubadas a temperaturas de 40, 50 e 60 °C por 72 h. Utilizou-se o substrato lipídico tributirina e as colônias formadoras de halos claros nas placas, indicativos de regiões de hidrólise do substrato pela ação da lipase secretada pelas colônias, foram selecionadas e repicadas até a obtenção de culturas puras.

Após a obtenção de colônias isoladas, estas foram transferidas para glicerol 10% e estocadas em *ultrafreezer* a – 80 °C.

#### 4.2 Caracterização dos Microrganismos

Testes de coloração de Gram, produção de catalase (TORTORA, 2012) e produção de oxidase por tiras para oxidase (New Prov, Brasil) foram realizados para a caracterização dos microrganismos lipolíticos obtidos.

#### 4.3 Ativação dos Microrganismos

A colônia que apresentou potencial lipolítico foi inoculada em um meio mínimo (Tabela 1) acrescido de uma fonte indutora 5% (óleo de soja). A ativação do microrganismo foi conduzida por 18 h a 37 °C, 150 rpm, utilizando-se *shaker* (Tecnal, TE-421).

Tabela 1: Composição do meio mínimo

Componentes	Quantidade (g/L)
KCl	0,3
MgSO <sub>4</sub>	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,87
CaCl <sub>2</sub>	0,29
ZnO	2,03x10 <sup>-3</sup>
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,7x10 <sup>-2</sup>
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,0x10 <sup>-2</sup>
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	8,5x10 <sup>-4</sup>
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,4x10 <sup>-3</sup>
NiCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,5x10 <sup>-4</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0x10 <sup>-4</sup>
Água destilada	1,0

Fonte: Nascimento (2004).



#### 4.4 Cultivo do Microrganismo e Indução da Produção de Lipases

Um meio de cultura foi preparado para a indução da produção de lipases (Tabela 2), utilizando óleo de soja como fonte indutora. Os reagentes foram pesados e transferidos para um *erlenmeyer*, o pH foi ajustado, utilizando hidróxido de potássio (KOH) 0,1 M, para 7,0. Importante enfatizar que o meio de cultura foi preparado em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. Posteriormente, o meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min.

Com o meio estéril, inoculou-se 4 mL de cultura ativada e enriquecida, conforme o item 4.3, para cada 100 mL de meio de cultura (Tabela 2). A incubação foi realizada utilizando *shaker* (Tecnal, TE-421) por 18 h a 40 °C e 150 rpm.

Tabela 2: Composição do meio de cultura

Componentes	Quantidade (g/L)
Indutor	5% (v/v)
Sacarose	20
Peptona	1
Extrato de Levedura	1
NaCl	0,1
MgSO <sub>4</sub>	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9
KCl	0,3
CaCl <sub>2</sub>	0,3
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,03
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0003

Fonte: Adaptado Corzo e Revah (1999).

#### 4.5 Obtenção do Extrato Enzimático

Para a obtenção do sobrenadante, fonte de lipases, o meio de cultura foi centrifugado, em tubos Falcon, sob as condições de 4 °C, 7000 g por 20 min em centrífuga (Thermo Fisher Scientific, Biofuge Stratos). As células foram descartadas e o sobrenadante guardado sob refrigeração. O extrato enzimático obtido a partir da amostra 1 foi identificado como extrato enzimático 1 e o extrato enzimático obtido a partir da amostra 2 foi identificado como extrato enzimático 2.

#### 4.6 Termoestabilidade e Ensaio Enzimático

Para a análise da estabilidade térmica das lipases, o extrato enzimático foi pré-incubado a 40 °C por 24 h e amostras enzimáticas foram coletadas nos respectivos

tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. Em seguida, cada amostra coletada foi submetida ao ensaio enzimático, em triplicata. Este ensaio foi realizado a 37 °C por 15 min, com a adição das amostras enzimáticas coletadas a uma emulsão preparada com soro (soro em solução emulsificante de lecitina de soja 10 % e tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0). Ensaios controle foram realizados com a adição de água em substituição ao extrato enzimático (branco). Após os 15 min de ensaio, a reação foi paralisada com a adição de solução de acetona/etanol (1:1 v/v). A atividade enzimática foi determinada de acordo com Leal (2000), através da quantificação dos ácidos graxos livres liberados durante a hidrólise utilizando o método de titulação com NaOH 0,05 M e fenolftaleína a 1 %. A atividade enzimática foi determinada através da equação (1). Para aumentar a confiabilidade dos dados obtidos, realizou-se o controle do pH (Tecnopon, NT PHM) durante as titulações.

$$A = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 1000}{t \times V_c} \quad (1)$$

Em que:

A = atividade enzimática (U/mL)

V<sub>a</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL)

V<sub>b</sub> = volume de NaOH gasto na titulação do branco (mL)

V<sub>c</sub> = volume da amostra enzimática usada na reação (mL)

t = tempo da reação (min)

M = molaridade da solução de NaOH.

#### 4.7 Coleta do Efluente

O soro de leite utilizado foi proveniente da produção de queijo muçarela do Laticínios Lindo Vale do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais (IF Sudeste MG) – *Campus* Rio Pomba. Dois soros (A e B) foram coletadas, provenientes de produções em dias diferentes, durante a etapa de dessoragem em um frasco previamente esterilizado e transportado em recipiente térmico para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IF Sudeste MG, *Campus* Rio Pomba, onde foram acondicionados sob refrigeração, até a realização das análises.

#### 4.7.1 Caracterização do Efluente

Análises físico-químicas foram realizadas, em duplicata, com finalidade de caracterização do soro. As seguintes análises foram realizadas: sólidos totais, cinzas, proteínas pelo método Kjeldahl, pH, acidez em graus Dornic (ZENECON, PASCUET e TIGLEA, 2008) e gordura pelo butirômetro de Gerber (BRASIL, 2006).

#### 4.8 Pré-tratamento Enzimático do Efluente

O efluente foi pré-tratado com a adição do extrato enzimático (188 U) a uma emulsão de soro (efluente) e lecitina de soja a 10 % (1:4 v/v), diluída em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. Os pré-tratamentos foram realizados utilizando-se os extratos enzimáticos 1 e 2 de forma individual e em combinação. Experimento controle foi realizado com a substituição da enzima por água destilada. Os experimentos (enzimático e controle) foram incubados a 40 °C por 24 h, sob agitação. Amostras do pré-tratamento foram coletadas e paralisadas com a adição de solução de acetona/etanol (1:1 v/v) nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. A eficiência da hidrólise enzimática do efluente foi avaliada através da determinação do teor de ácidos graxos livres totais liberados segundo Durli (2007). Os teores de ácidos graxos livres foram quantificados pela equação (2), em triplicata, pelo método de titulação com NaOH 0,05 M e fenolftaleína a 1 % e controle do pH em pHmetro (Tecnocon, NT PHM) durante as titulações.

$$AL = \frac{V(\text{NaOH})M(\text{NaOH})1000}{V_a} \quad (2)$$

Em que:

AL = teor de ácidos livres (mmoles/mL)

V (NaOH) = volume de solução de NaOH usado na titulação (mL)

M (NaOH) = concentração da solução de NaOH (mol/L)

V<sub>a</sub> = volume da amostra titulada (mL)

O teor de ácidos graxos livres obtido em cada pré-tratamento, devido à ação da lipase, foi determinado descontando-se os ácidos graxos livres presentes no experimento controle.

#### **4.9 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)**

A DBO corresponde à quantidade de oxigênio necessária para a metabolização da matéria biodegradável por microrganismos ou por suas enzimas, nas condições do ensaio (MORAIS, 2005).

A análise da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) foi determinada pelo método 5210 B segundo procedimento padrão (APHA, 2005), utilizando oxímetro digital coletor de dados com Software DO-5519 (Impac). Este teste bioquímico empírico se baseia na diferença de concentrações de oxigênio dissolvido em amostras integrais ou diluídas, durante um período de incubação de 5 dias a 20 °C. O que é medido de fato nesta análise é a concentração de oxigênio dissolvido antes e depois do período de incubação.

#### **4.10 Demanda Química de Oxigênio (DQO)**

A DQO corresponde à quantidade de oxigênio consumido na oxidação química da amostra por dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) em meio fortemente ácido, em temperaturas elevadas e na presença de catalisador (MORAIS, 2005). A DQO, avaliada em amostras tratadas e não-tratadas enzimaticamente, foi determinada pelo método colorimétrico-padrão de refluxo fechado (APHA, 2005), com  $K_2Cr_2O_7$  em meio ácido, contendo sulfato de prata ( $Ag_2SO_4$ ) como catalisador e sulfato de mercúrio ( $HgSO_4$ ) para eliminar a interferência de cloretos presentes na amostra. As amostras foram diluídas (1:500 a 1:4.500) e em seguida, os reagentes previamente citados foram adicionados. Os tubos foram colocados em digestor (Solab) e mantidos a 148 °C por 2 h. Após o resfriamento dos tubos, a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Bel Photonics) a 600 nm.

Para esta análise, elaborou-se uma curva de calibração (Figura 2) para a determinação da DQO de cada amostra. Para a elaboração da curva de calibração, utilizou-se quantidades crescentes de biftalato de potássio ( $C_8H_5KO_4$ ), acrescido de volumes fixos da solução digestora de dicromato de potássio e da mistura catalítica contendo ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e sulfato de prata. Os tubos foram então colocados em digestor (148 °C por 2 h) e após o resfriamento, a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm. O cálculo da DQO foi realizado baseando-se em que cada miligrama (mg) do sal teoricamente equivale a uma DQO de 1,176 mg  $O_2$ /mg e essa solução tem DQO de 500 mg de  $O_2$ /L (APHA, 2005).

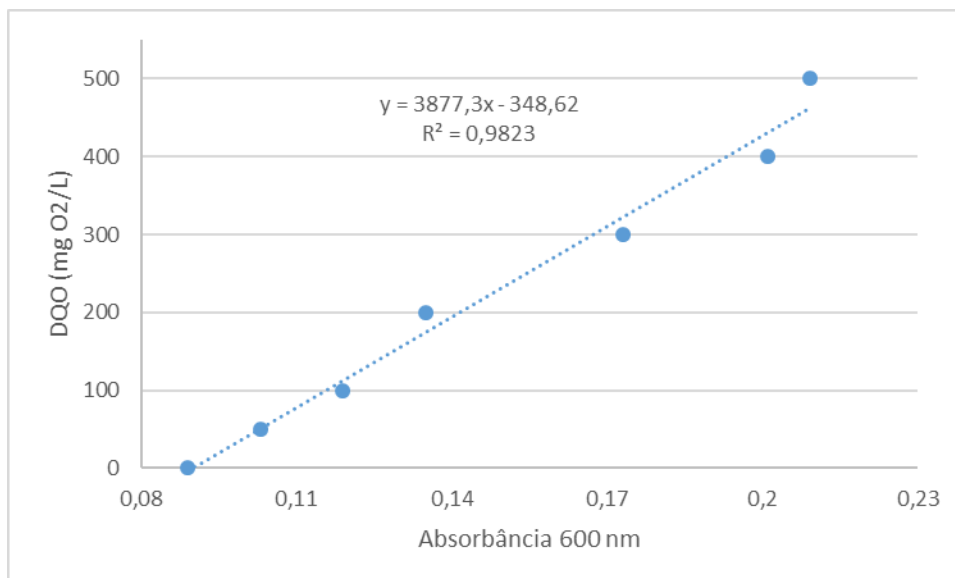


Figura 2: Curva de calibração para a demanda química de oxigênio (DQO) em mg O<sub>2</sub>/L.

#### 4.11 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A estabilidade térmica foi avaliada por meio de regressão linear; os pré-tratamentos pelo teste de Tukey 5% e as análises de DBO foram avaliadas através de uma variância fatorial 2/3, seguido de teste de Tukey 5%, realizado por *Statistica 13* (DELL, 2015).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Obtenção e Isolamento dos Microrganismos Lipolíticos

O ensaio em placa, contendo tributirina, possibilitou a seleção de microrganismos lipolíticos que produziam lipases ativas para serem empregadas no pré-tratamento de efluentes. A tributirina foi utilizada neste ensaio por ser um substrato lipídico de coloração amarelada que permite a detecção de colônias produtoras de lipases que são secretadas para o meio externo e que ao hidrolisarem o substrato evidenciam a formação de halos de hidrólise. A Figura 3 ressalta os halos transparentes ao redor das colônias lipolíticas.

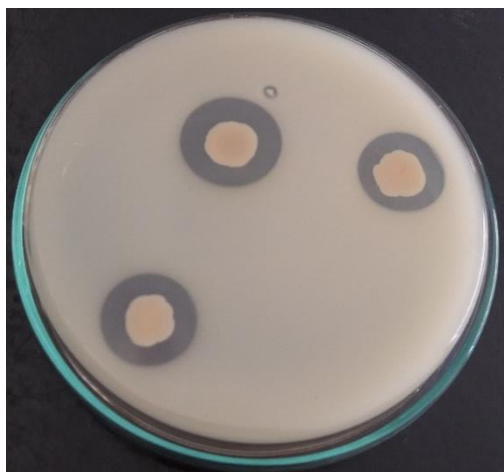


Figura 3: Halos de hidrólise ao redor do isolado produtor de lipase obtido de leite cru.

As colônias isoladas que formaram halos, provenientes das amostras 1 e 2, foram utilizadas como produtores de lipases para a aplicação no pré-tratamento enzimático.

Como muitos processos industriais são realizados em temperaturas mais elevadas, para aumentar o espectro de aplicação biotecnológica das lipases, testes de isolamento de microrganismos lipolíticos em temperaturas como 50 e 60 °C foram realizados. Estes ensaios não permitiram a obtenção de microrganismos que apresentassem atividade lipolítica e além disso, fossem produtores de lipases ativas em temperaturas elevadas. Pesquisas realizadas por Dors (2006), também mostraram que lipases apresentaram maior potencial de hidrólise de lipídeos em temperaturas entre 37 a 45 °C.

Uma das amostras utilizadas nesta etapa foi o leite cru (amostra 1). Este material, normalmente, contém poucas bactérias termorresistentes, embora com capacidade de se desenvolverem no leite quando mantido a temperaturas elevadas (ICMSF, 1994). Este pode ser um dos fatores que justifica a dificuldade na obtenção de microrganismos lipolíticos capazes de se desenvolverem em temperaturas mais elevadas.

Dessa forma, baseando-se nestes resultados, a temperatura definida para a realização dos ensaios de pré-tratamento enzimático foi 40 °C.

## 5.2 Caracterização dos Microrganismos

Ensaio preliminares para a caracterização do microrganismo lipolítico indicaram que a colônia isolada do leite cru, denominada amostra 1 foi classificada

como bastonete Gram-positivo como evidenciado na Figura 4. O ensaio de catalase indicou resultado positivo e o de oxidase, negativo.



Figura 4: Resultado da coloração de Gram da bactéria lipolítica isolada do leite cru.

Dentre as bactérias Gram positivas encontradas no leite estão incluídas as bactérias lácticas, os micrococcos e estafilococos, as bactérias esporuladas e outros representantes patogênicos (TRONCO, 2003). O leite cru mantido sob temperaturas de refrigeração por muitos dias, apresenta, muitas ou todas as bactérias dos gêneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, assim como alguns representantes de pelo menos um dos gêneros do grupo coliformes (JAY, 2005).

Estes ensaios iniciais permitiram o conhecimento de algumas características do microrganismo isolado, porém experimentos de caracterização adicionais são necessários para a definição do gênero desta bactéria lipolítica.

### 5.3 Ensaio Preliminares

#### 5.3.1 Termoestabilidade Enzimática

A estabilidade térmica das enzimas é uma das características avaliadas para direcioná-las às mais diversas aplicações biotecnológicas, considerando que muitos processos industriais são realizados em temperaturas elevadas. Assim, lipases obtidas de bactérias termoresistentes tem papel importante na indústria (JAEGER e REETZ, 1998; FERNANDES, 2006). A termoestabilidade das lipases, na temperatura definida para o tratamento, foi avaliada para a definição do melhor tempo de pré-tratamento enzimático. De acordo com a Tabela 3, observa-se que as enzimas, provenientes das amostras 1 e 2, permaneceram ativas até 24 h de incubação a 40

°C. Após 24 h, a atividade das enzimas já era bastante reduzida até atingir o valor zero no tempo de 48 h.

Tabela 3: Estabilidade térmica dos extratos enzimáticos a 40 °C.

Tempo (horas)	Média da atividade (U/mL) + desvio padrão	Média da atividade (U/mL) + desvio padrão
	Extrato Enzimático 1	Extrato Enzimático 2
0	1,28 ± 0,18	3,00 ± 0,33
2	1,80 ± 0,05	3,26 ± 0,15
4	1,92 ± 0,00	3,22 ± 0,50
8	2,06 ± 0,24	3,00 ± 0,67
12	1,39 ± 0,10	3,47 ± 0,55
24	1,03 ± 0,21	3,69 ± 0,54

Como o extrato enzimático 2 apresentou valores de atividade mais elevados, testes de termoestabilidade a 50 °C foram realizados com esta enzima. Os testes evidenciaram que o mesmo apresentava baixa estabilidade na temperatura testada, apresentando os seguintes valores de atividade enzimática nos tempos 0, 2 e 4 h de pré-incubação, respectivamente: 1,39; 1,1 e 0 U/mL.

Confirmando os resultados obtidos anteriormente nos ensaios de isolamento dos microrganismos lipolíticos e buscando uma maior redução da carga lipolítica do efluente, os ensaios de pré-tratamento enzimático foram realizados a 40 °C por 24 h.

### 5.3.2 Pré-Tratamento Enzimático do Efluente

Conforme observado na Figura 5, o pré-tratamento enzimático foi conduzido por 24 h, sendo que o teor de ácidos graxos livres produzido foi monitorado, nos experimentos controle e enzimático, nos tempos 0, 2, 4, 8, 12 e 24h.



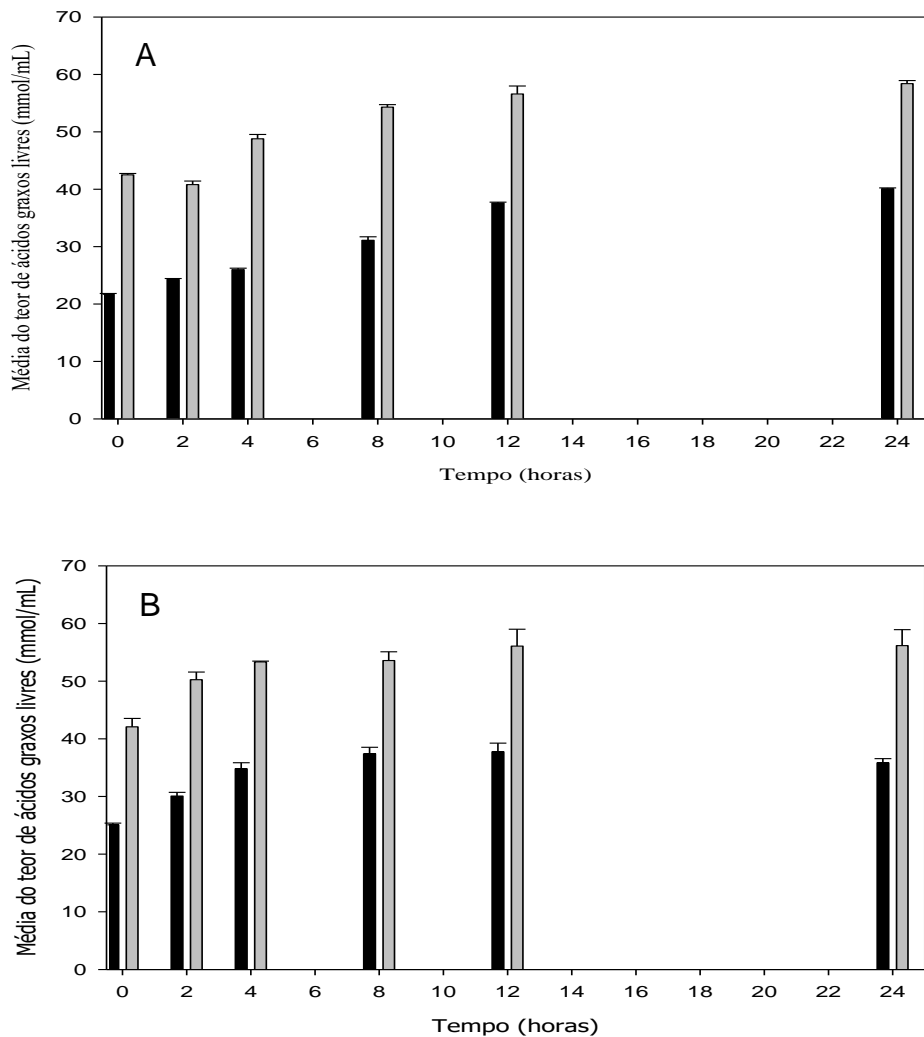


Figura 5: Média do teor de ácidos graxos livres ao longo do tratamento enzimático do efluente. A – pré-tratamento realizado com o extrato enzimático 1. B - pré-tratamento realizado com o extrato enzimático 2. Barras em preto indicam a média do controle e barras em cinza indicam a média dos tratamentos enzimáticos.

No pré-tratamento A, as médias dos teores de ácidos graxos livres nos tempos 0 e 2 h são estatisticamente iguais. Sendo assim, observa-se que, para esta cultura bacteriana, a produção efetiva de ácidos graxos livres pela ação da lipase é iniciada às 4 h de tratamento enzimático. As médias nos tempos 12 e 24 h não diferem estatisticamente entre si. Sendo assim, a produção efetiva de ácidos graxos livres permanece até às 12 h de tratamento ( $p > 0,05$ ). No pré-tratamento B, observa-se produção efetiva de ácidos graxos livres pela ação da lipase até 12 h de tratamento ( $p > 0,05$ ).

Na interpretação dos dados, deve-se considerar a presença de ácidos graxos livres já presentes no efluente, bem como aqueles produzidos pela ação de

microrganismos. Estes utilizam a matéria orgânica para o próprio crescimento e contribuem para o aumento dos ácidos graxos livres no efluente mesmo antes da atuação da lipase. Estes fatores também foram observados por Durli (2007). Dessa forma, observa-se que o teor de ácidos graxos livres aumenta ao longo do tempo no experimento controle. Sendo assim, é muito importante a realização do experimento controle em cada tempo para que esta interferência possa ser descontada e possibilite uma avaliação efetiva da ação das lipases no efluente.

O pré-tratamento enzimático não apresentou produção efetiva de ácidos graxos livres após 24 h. Este comportamento pode ser justificado pela redução da atividade enzimática com o passar do tempo. Acrescido a este fator, autores ainda verificaram que a redução da concentração de ácidos graxos livres após 24 h pode ser explicada pelo crescimento de microrganismos no efluente, que podem utilizar os ácidos livres como fonte de carbono (DURLI, 2007).

Com o objetivo de aumentar a produção de ácidos graxos livres, realizou-se um tratamento enzimático combinando-se os dois extratos enzimáticos na temperatura de 40 °C por 12 h. Este experimento apresentou resultados interessantes, pois observou-se um aumento de 2,4 vezes na produção de ácidos graxos livres após 12 h de tratamento; valores superiores aos encontrados utilizando-se os extratos 1 e 2 de forma individual nos pré-tratamentos.

Após estes testes iniciais, decidiu-se utilizar extrato enzimático 1 nos próximos experimentos, pois mesmo apresentando menores valores de atividade enzimática, a mesma mantinha-se ativa por mais tempo quando armazenada sob refrigeração.

## **5.4 Avaliação do Pré-Tratamento Enzimático Utilizando o Extrato Enzimático 1**

### **5.4.1 Caracterização do Efluente**

Os resultados das análises físico-químicas dos soros de muçarela são apresentados na Tabela 4. O soro A foi utilizado nos ensaios de estabilidade e pré-tratamento enzimático e o soro B foi utilizado para a realização dos ensaios de DBO e DQO.

Tabela 4: Resultados das análises físico-químicas dos soros A e B (média  $\pm$  desvio padrão).

Soro de queijo muçarela	A	B
pH	6,45 $\pm$ 0,00	6,39 $\pm$ 0,00
Acidez ( $^{\circ}$ D)	14 $\pm$ 0,00	14 $\pm$ 0,00
Sólidos totais (g/100g)	8,95 $\pm$ 0,07	8,75 $\pm$ 0,78
Cinzas (g/100g)	0,59 $\pm$ 0,00	0,6 $\pm$ 0,00
Proteína (g/100g)	0,91 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,05
Gordura (g/100g)	0,3 $\pm$ 0,00	0,3 $\pm$ 0,00
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	143,15 $\pm$ 69,72	208,32 $\pm$ 82,79
DBO (mg O <sub>2</sub> /L)	11800 $\pm$ 346,41	14700 $\pm$ 519,62

Os valores de pH, acidez e sólidos totais estavam em conformidade com os valores estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite (BRASIL, 2013).

Os valores obtidos foram semelhantes aos resultados encontrados por Teixeira e Fonseca (2008), que obtiveram pH de 6,19, acidez de 13,17  $^{\circ}$ D, sólidos totais de 6,33 g/100g, gordura de 0,77 g/100, proteínas 0,84 g/100g e cinzas de 0,47 g/100g para queijo muçarela. Bald *et al.* (2014) apresentou médias da composição físico-química de soro de muçarela, com 0,52 g/100g de cinzas, 0,84 g/100g de proteína, 0,32 g/100g de gordura, pH de 5,53 e valor de 75,241 mg/L de DQO.

Frigon *et al.* (2009) afirma que o soro possui uma elevada carga orgânica com DBO variando entre 30.000 e 50.000 mg/L e DQO entre 50.000 e 70.000 mg/L. Comparativamente, os valores encontrados de DQO e DBO para os soros de muçarela coletados foram menores.

Observa-se, porém, que as características físico-químicas dos soros A e B são parecidas, o que possibilita a comparação dos resultados das análises de pré-tratamento enzimático, DQO e DBO dos efluentes.

#### 5.4.2 Termoestabilidade Enzimática

Considerando que, segundo os ensaios preliminares, a produção efetiva de ácidos graxos livres ocorreu até 12 h de tratamento, os novos ensaios de estabilidade térmica das lipases foram realizados possuindo 12 h como tempo máximo de pré-incubação das enzimas. Dessa forma, a estabilidade térmica da lipase foi avaliada ao

longo de 12 h, incluindo agora, o tempo de 6 h de incubação. De acordo com a Tabela 5 e na Figura 6, observa-se que as enzimas permaneceram ativas até 12 h de incubação a 40 °C.

Tabela 5: Estabilidade térmica do extrato enzimático 1 a 40°C.

Tempo (horas)	Média da atividade (U/mL) + desvio padrão
0	1,05 ± 0,05
2	3,14 ± 0,05
4	1,81 ± 0,10
6	1,81 ± 0,13
8	1,31 ± 0,10
12	1,28 ± 0,05

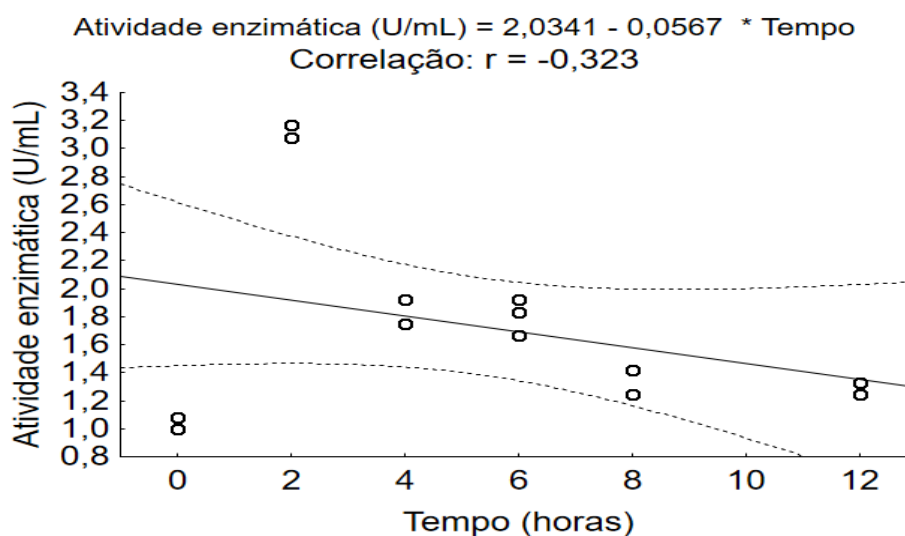


Figura 6: Estabilidade térmica do extrato enzimático 1 a 40°C.

Moraes (2014) constatou o decaimento da estabilidade térmica da lipase livre de *Fusarium solani* que, em apenas 3 h, perdeu, aproximadamente, 50% da sua atividade quando incubada a 40 °C. Carvalho *et al.* (2005) testaram a estabilidade térmica de lipases de diferentes fontes microbianas, nas quais foram incubadas por 1 h em temperaturas entre 35 e 70 °C. Os autores observaram que estas enzimas permaneceram estáveis na faixa de temperatura de 35 a 45 °C. Basheer *et al.* (2011)

verificaram que a enzima do fungo *Aspergillus awamori* BTMFW032 foi ativa em um intervalo de temperatura de incubação, embora a de 40 °C apresentou o melhor resultado.

Como relatado, conclui-se que a avaliação da estabilidade térmica da lipase é de fundamental importância para a definição da temperatura e tempo do tratamento enzimático, sendo estas condições variáveis e dependentes do estudo bioquímico da enzima de interesse.

Pereira (2004) observou que a lipase de origem microbiana (*Candida rugosa*-LCR) apresentou uma atividade máxima na temperatura de 37 °C, enquanto que as preparações de lipases de origem animal (pâncreas de porco-LPP e pancreatina-LKM) apresentaram uma temperatura ótima de 45 e 40 °C, respectivamente. Além dos estudos de termoestabilidade enzimática, estas informações fortalecem a utilização de lipases em experimentos nas temperaturas próximas de 40 °C.

#### 5.4.3 Pré-tratamento Enzimático do Efluente

Os valores médios dos ácidos graxos livres produzidos durante o pré-tratamento do efluente, ao longo do tempo, utilizando o extrato enzimático 1 são demonstrados na Figura 7.

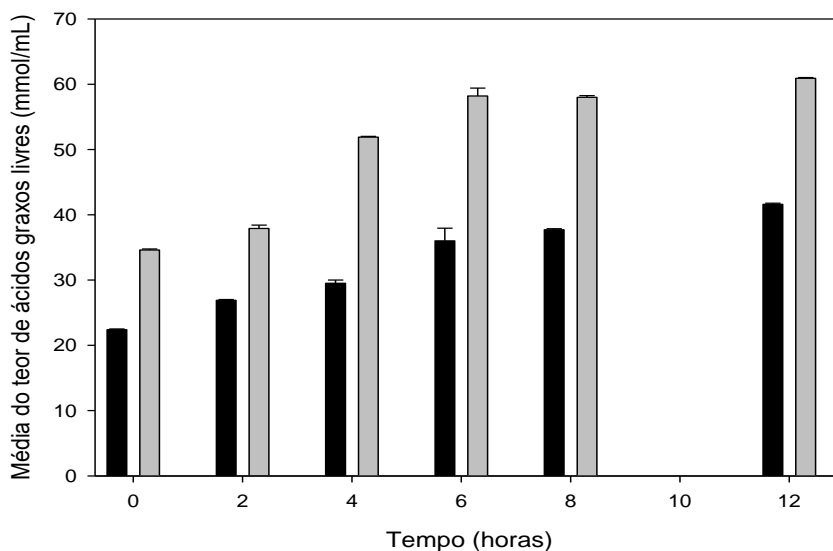


Figura 7: Média do teor de ácidos graxos livres ao longo do tratamento enzimático do efluente. Barras em preto indicam a média do controle e barras em cinza indicam a média dos tratamentos enzimáticos.

Observa-se que as médias dos teores de ácidos graxos livres nos tempos 6 e 8 h são estatisticamente iguais e uma maior produção de ácidos graxos livres foi observada no tempo de 12 h de pré-tratamento ( $p < 0,05$ ) (Figura 7). Sendo assim, inicialmente, sugere-se que esta enzima possa ser utilizada eficientemente até 12 h de tratamento.

Porém, como já enfatizado, é importante descontar os ácidos graxos livres existentes no experimento controle. A Figura 8 apresenta a produção de ácidos graxos livres devido à atuação da lipase descontando os ácidos graxos livres previamente existentes no efluente.

Observa-se agora que a produção efetiva de ácidos graxos livres pela ação da lipase é iniciada em 4 h de tratamento enzimático e não sofre alteração até 8 h de tratamento ( $p > 0,05$ ) (Figura 8), levando-nos a concluir que o tempo ideal de tratamento enzimático utilizando a lipase 1 é 4 h.

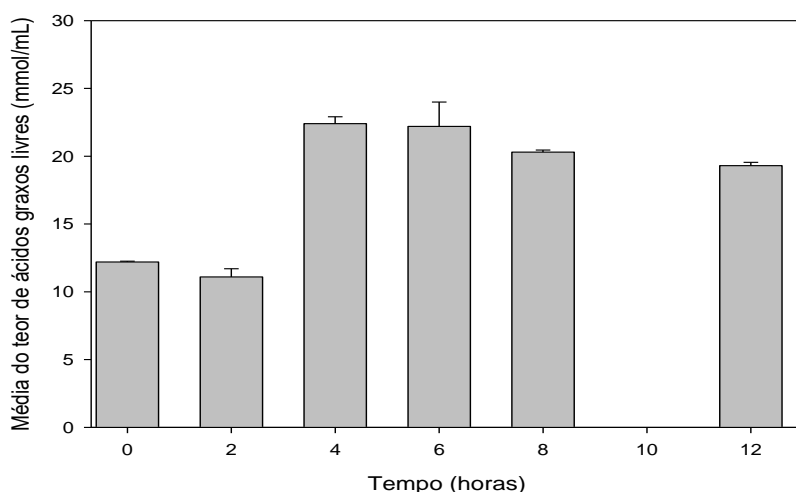


Figura 8: Média do teor de ácidos graxos livres ao longo do tratamento enzimático descontando-se o controle em cada tempo.

#### 5.4.4 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

Os ensaios de DBO foram realizados para serem correlacionados com os resultados obtidos através da metodologia de titulação que permitia a dosagem de ácidos graxos livres produzidos pela ação da lipase durante o pré-tratamento enzimático do efluente e, dessa forma, permitir a confirmação se as lipases atuam na redução da carga lipídica do efluente tratado.

A Tabela 6 e a Figura 9 mostram que o pré-tratamento enzimático diferiu estatisticamente do controle ao nível de 5% de significância, reduzindo a DBO (mg

O<sub>2</sub>/L) em 6,6%. Estes resultados demonstram que ocorreu a hidrólise lipídica de matéria orgânica pela ação das lipases culminando na redução da quantidade de oxigênio necessária para a metabolização da matéria biodegradável.

Tabela 6: Média de DBO (mg O<sub>2</sub>/L) nos diferentes tempos do pré-tratamento (controle e tratamento)

Tratamento	Tempo	Média DBO (mg O <sub>2</sub> /L)
Controle	0	14100,00 b
Controle	6	16500,00 cd
Controle	12	16400,00 c
Tratamento	0	17500,00 d
Tratamento	6	13800,00 ab
Tratamento	12	12800,00 a

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

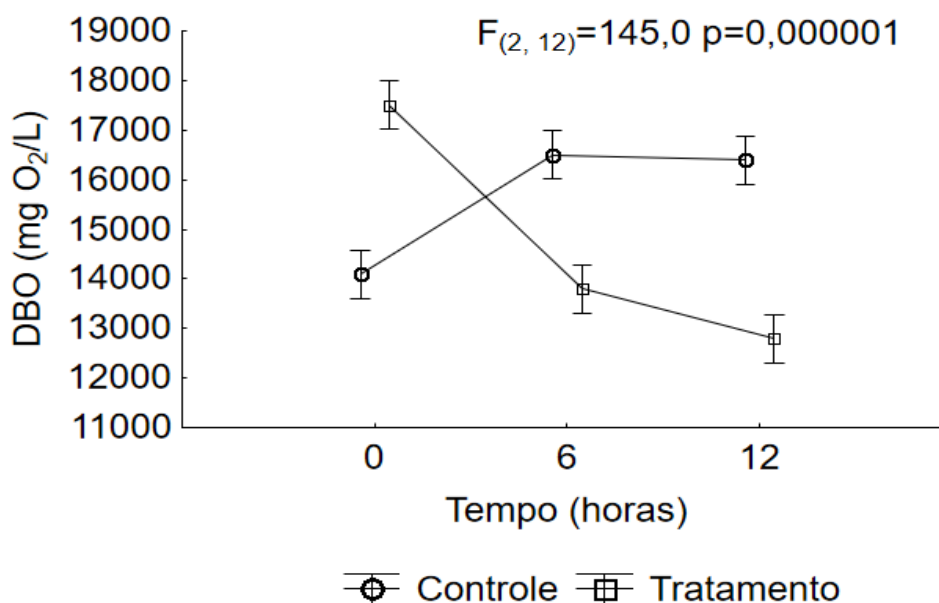


Figura 9: Média de DBO (mg O<sub>2</sub>/L) nos diferentes tempos do pré-tratamento (controle e tratamento).

A média de DBO no tratamento no tempo 0 h foi estatisticamente diferente das médias dos tempos 6 e 12 h, indicando uma redução da DBO nas 6 horas iniciais do tratamento enzimático. Porém as médias nos tempos 6 e 12 h foram estatisticamente

iguais, evidenciando que após 6 horas de tratamento a demanda bioquímica de oxigênio não sofreu alteração. Sendo assim, de acordo com este experimento, o pré-tratamento enzimático utilizando a lipase 1 é eficiente até 6 h.

Esperava-se valores de DBO próximos para todos os tempos do controle e atribui-se a um erro analítico o valor reduzido de DBO obtido no tempo 0 h do controle.

Correlacionando os resultados de DBO obtidos com a produção efetiva de ácidos graxos livres, sugere-se utilizar a lipase 1 no intervalo de tempo entre 4 e 6 h de pré-tratamento enzimático para a redução da carga lipídica do efluente antes do mesmo ser conduzido sequencialmente às etapas convencionais de tratamento baseadas na fermentação anaeróbica. Será interessante também, em experimentos futuros, avaliar a eficiência do pré-tratamento enzimático neste intervalo de tempo entre 4 e 6 h.

Roveda (2007), através da caracterização dos efluentes da indústria de laticínios, encontrou na saída do equalizador valores para DBO de 452,0 mg/L e DQO de 803,27 a 4.975,95 mg/L. Já na saída do aerador os valores encontrados de DBO foram de 255,3 mg/L e DQO de 76,58 a 2.810,22 mg/L. Ao final do processo de tratamento, obteve-se reduções da matéria orgânica contida nos efluentes da indústria de laticínios utilizando enzimas produzidas pelos fungos isolados dos próprios efluentes, durante a realização do processo fermentativo, cujos valores das concentrações para o efluente da saída do equalizador foi DQO  $835,97 \pm 17,26$  mg/L e para o efluente da saída do aerador foi DQO  $115,90 \pm 61,37$  mg/L.

Vilela (2012) observou a redução da DBO em 93,69% e da DQO em 95,54% pela linhagem *Cunninghamella elegans* URM6017 em meio contendo o efluente sólido de indústria de sorvete, após o 17º dia de tratamento enzimático.

Vale ressaltar que estes valores de DBO e DQO extraídos da literatura levam em consideração o processo completo de tratamento de efluentes, que incluem o pré-tratamento enzimático e as diversas etapas do tratamento convencional, possibilitando assim, reduções significativas nos valores de DQO e DBO. O objetivo deste trabalho foi enfatizar que a etapa prévia de tratamento enzimático utilizando lipases contribui para a redução da carga lipídica facilitando as etapas subsequentes de tratamento de efluentes, otimizando reduções nos valores de demanda química e bioquímica dos efluentes tratados e além disso, possibilitando a diminuição da poluição hídrica.



#### **5.4.5 Demanda Química de Oxigênio (DQO)**

Mesmo após todas as diluições testadas, não foi possível determinar a demanda química de oxigênio. Uma possível explicação seria a interferência do etanol utilizado para paralisar os pré-tratamentos com lipase.

Segundo Andrade e Coscione (2001), a reação de oxidação de um álcool primário, como o etanol, com íons dicromato envolve pelo menos duas etapas. Na primeira etapa, o etanol reage com os íons dicromato produzindo um aldeído. Na segunda etapa, como o aldeído produzido também é susceptível à oxidação, ele é consumido, produzindo ácido acético, com a correspondente redução dos íons Cr(VI) para íons Cr(III).

Essas reações de oxi-redução podem ser exemplificadas pelo mecanismo dos bafômetros, que contém uma mistura sólida de solução aquosa de dicromato de potássio e sílica, umedecida com ácido sulfúrico. Nestes instrumentos, a solução de íons dicromato, de coloração laranja característica, reage com o etanol, havendo uma mudança de coloração desta solução para um tom esverdeado. É esta mudança de cor, decorrente da reação de óxido-redução envolvida, que é utilizada para quantificar o etanol (BRAATHEN, 1997).

### **6. CONCLUSÃO**

Observou-se que a obtenção de lipases, provenientes de microrganismos isolados do ambiente, que apresentem elevado potencial lipolítico e também estabilidade térmica em altas temperaturas é bastante limitado. Por isso, muitos dos tratamentos enzimáticos utilizando lipases são realizados em temperaturas na faixa de 37 a 40 °C, onde verifica-se uma maior atividade destas enzimas.

Após o estudo de termoestabilidade das enzimas, observou-se que as enzimas permaneceram ativas até 24 h a 40 °C. Os pré-tratamentos utilizando os extratos enzimáticos 1 e 2, e também o tratamento utilizando a combinação das mesmas, apresentaram aumento na produção de ácidos graxos livres. Durante o pré-tratamento, o extrato enzimático obtido de bactéria isolada do leite cru produziu ácidos graxos livres de forma efetiva a partir de 4 h de tratamento enzimático até as 12 h do experimento. Já o extrato enzimático 2, obtido de bactéria isolada de contaminação natural em placas de Petri, mostrou produção efetiva de ácidos graxos livres até 12 h de tratamento.

De acordo as análises de DBO, o pré-tratamento enzimático utilizando o extrato enzimático 1 é eficiente até 6 h. Sendo assim, correlacionando os resultados de DBO com a produção efetiva de ácidos graxos livres, sugere-se utilizar o extrato enzimático 1 no intervalo de tempo entre 4 e 6 h de pré-tratamento para a redução da carga lipídica do efluente.

Em experimentos futuros, como estratégia para eliminar a possível interferência do etanol nos experimentos de DQO, sugere-se que, ao invés de paralisar o pré-tratamento enzimático com a solução de etanol e acetona, desnaturar a lipase e interromper o pré-tratamento com a adição da solução ácida utilizada nos ensaios de DQO, realizando este ensaio imediatamente após sua adição.

## **7. PERSPECTIVAS**

Para viabilizar economicamente este tipo de tratamento, alguns fatores técnicos devem ser considerados. É preciso compreender detalhadamente os processos industriais responsáveis pela produção dos efluentes, como suas variações ao longo do tempo, os insumos empregados, o regime de descarga dos efluentes, o procedimento para limpeza das instalações, sua frequência e produtos utilizados para essa finalidade. Todos esses detalhes operacionais podem influenciar na qualidade dos efluentes. É necessário também fazer uso de preparações enzimáticas ativas e otimizar as condições adequadas de hidrólise. Diversos trabalhos da literatura atuam na otimização destes processos enzimáticos, estabelecendo as condições (concentração de enzima, temperatura, tempo e emulsificante) que forneçam uma maior redução da carga orgânica de efluentes.

Dessa forma, apesar dos resultados interessantes, demonstrando que a etapa de pré-tratamento enzimático utilizando lipases contribui para a redução da carga lipídica de efluentes, experimentos de otimização do processo podem ser realizados para potencializar a atuação das mesmas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J.L.; DEMAIN A.L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolec.** v.4, n.1, p.117–39, febr, 2014.

AITKEN, M.D.; MASSEY, I.J.; CHEN, T., HEILER, S. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. **Water Research**, v.28, n. 9, p.1879-1889, 1994.

ANDRADE, J.C.; COSCIONE, A.R. Simulação de um bafômetro. **Chemkeys. Licenciado sob Creative Commons (BY-NC-SA)**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2001.

ANDRADE, L.H. **Tratamento de efluente de indústria de laticínios por duas configurações de biorreator com membranas e nanofiltração visando o reuso**. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia, Belo Horizonte, 2011. 231 p.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 19th ed. American Public Health Association, Washington DC, USA, 2005.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BALD, J.A.; VINCENZI, A.; GENNARI, A.; NEUTZLING, L.; SOUZA, C.F.V. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no Vale do Taquari, RS. **Revista Jovens Pesquisadores**, Santa Cruz do Sul, v. 4, n. 1, p. 90-99, 2014.

BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. 163 p.

BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1-3, p. 381-386, 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, october, 2011.

BRAATHEN, C. Hálito culpado: O princípio químico do bafômetro. **Química Nova Na Escola**, n. 5, maio, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 53, de 10 de abril de 2013. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2013.

BRÍGIDA, A.I.S.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z.; GONÇALVES, L.R.B. Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.101, p.148-158, 2013.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado** (1 ed.). Rio de Janeiro: Interciência Brasil. 2008.

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2195- 2210, 2006.

CANTO, W.L.; MENEZES, T.J.B. **Estudos econômicos – Alimentos Processados, produção, usos e mercado de enzimas**. Campinas, ITAL, n. 29, p. 1-53. 1995.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Quim. Nova**, v. 26, p.75-80. 2003.

CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.Ap.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Quim. Nova**, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

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

CERNIA, E.; DELFINI, M.; DI COCCO, E.; PALLOCI, C.; SORO, S. Investigation of lipase-catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: use of NMR spectroscopy methods to study substrate–enzyme interaction. **Bioorg. Chem.**, v. 30, p. 276-284, 2002.

COELHO, M.A.Z.; LEITE, S.G.F.; ROSA, M.D.F.; FURTADO, A.A.L. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Ceppa**, v. 19, n. 01, p. 3342. 2001.

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

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quím. Nova**, v. 27, n. 4, São Paulo, july/aug, 2004.

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. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95 p.241– 246, 2012.

DELL INC. **Dell Statistica** (2016), version 13. software.dell.com, 2015.

DORS, G. **Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. 101 p.

DURLI, E. **Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de Burkholderiacepacia LTEB11**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007. 111 p.

FERNANDES, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FICKERS, P.; ONGENA, M.; DESTAIN, J.; WEEKERS, F.; THONART, P. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica* Enzyme. **Microb. Technol**, v.38, p. 756–759, 2006.

FREIRE, D.M.A.; CASTILHO, L.R. **Lipases em biocatálise**. Rio de Janeiro (Rio de Janeiro): Editora Interciência; Capítulo 16, In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. 2008. 506 p

FRIGON, J.C.; BRETON, J.; BRUNEAU, T.; MOLETTA, R.; GUIOT, S.R. The treatment of cheese whey wastewater by sequential anaerobic and aerobic steps in a single digester at pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4156-4163, 2009.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. FEAM. **Iniciação ao desenvolvimento sustentável**. Belo Horizonte: FEAM, p. 349, 2003.

GASPARIN, F.G.M.; MAGRI, A.; NEVES, A.F.; CELLIGOI, M.A.P.C. Produção de Lipase e Biossurfactante por Isolado de Efluente de Laticínio. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 28-31, 2012.

GHOTRA, B.S.; DYAL, S.D.; NARINE, S.S. Lipidshortenings: a review. **Food Res. Int**, v. 35, p. 1015-1048. 2002.

GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 375- 384, 2010.

GUTARRA, M.L.E.; GODOY, M.G.; MAUGERIB, F.; RODRIGUES, M.I.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5249–5254. 2009.

HARALDSSON, G.G. The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. *Mar. Lipids Biotechnol*, v. 7, p-337-352, 1991.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2015\\_v43\\_br.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf)> Acesso em 14 nov. 2016.

ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS). **Microrganismos de los alimentos**. 1. Técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia. 1994. 804 p.

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

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6° ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JAYAPRAKASH, A.; EBENEZER, P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p.113-117, 2010.

KROLOW, A.C.R. **Soro de queijo, alimento nutritivo e funcional**. Embrapa Clima Temperado – Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E), 2013. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/artigo/soro-de-queijo-alimento-nutritivo-e-funcional-3581>> Acesso em: 14 nov. 2016.

KUSHWAHA, J.P.; SRIVASTAVA, V.C.; MALL, I.D. Treatment of dairy wastewater by commercial activated carbono and bagasse fly ash: Parametri, Kinetic and equilibrium modelling, disposal studies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3474-3843, 2010.

LEAL, M.C.M.R. **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios**. Dissertação de Mestrado, COOPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2000.

LEAL, M.C.C.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 19, n. 2, 2002.

LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy waste-water, **Process Biochem**, v. 41, p. 1173–1178, 2006.

MACHADO, R.M.G.; SILVA, P.C.; CASSEB, M.M.S.; FREIRE, V.H. **Sistemas de tratamento utilizados para efluentes líquidos de laticínios**, p. 375-385. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária, Rio de Janeiro. 1999.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JR., A. Application of lipases for waste water treatment containing high levels of lipids, **Quim. Nova**, n. 28, 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 biodigestion. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 185–190, 2006.

MINAS GERAIS (Estado). Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG n° 01, Diário executivo Minas Gerais de 05 de maio de 2008. **Diário Oficial de Minas Gerais**, Poder executivo, Belo Horizonte, MG, 13 de maio 2008.

MORAES, M.R. **Caracterização da lipase de *Fusarium solani* para aplicação em biocatálise**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. 105 p.

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

NASCIMENTO, W.C.A. **Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus sp. SMIA-2* e sua compatibilidade com detergentes comerciais**. Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 2004. 96 p.

PEREIRA, E.B. **Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil. 2004. 154 p.

PEREIRA, E.B.; FURIGO Jr., A.; CASTRO, H.F. **Tratamento enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas**. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, fev. 2004.

PINHEIRO, T.L. **Produção de lipases por fermentação m estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. URI, Campus de Erechim, Erechim, 2006. 120 p.

POLITZER, K.; BON, E.P.S. **Enzimas Industriais e Especiais**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, mai. 2006.

PORTO, L.M.; SANTOS, R.C.; MIRANDA, T.L.S. Determinação das melhores condições operacionais no processo de produção de ricota. **Boletim CEPPA**, v. 23, n.1, p.173-182, 2005.

PRIYA, K.; CHADHA, A. Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase. **Enzyme Microb. Technol**, v.32, p. 485-490, 2003.



RAMANI, K.; JOHN KENNEDY, L.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1683–1691, 2010.

REETZ, M.T. Lipases as practical biocatalysts. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 6, p. 145-150. 2002.

REIS, R.L.S.; LEÃO, N.S.R.; SOUZA, A.F.; SILVA, G.K.B.; LUNA, M.A.C.; SILVA, C.A.A.; OKADA, K. Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus parasiticus* UCP 1281 no biotratamento de efluentes da indústria de laticínios e produção de lipídeos. Editora UNIBH, **e-xacta**, Belo Horizonte, v. 8, n. 1, p. 31-42, 2015.

RIGO, E.; RIGONI, R.E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D.M.G.; DI LUCCIO, M. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. **Environ. Sci. Eng.** v. 25, p. 1243–1249, 2008.

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

ROVEDA, M. **Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa**. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, p. 10-28, 2007.

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

SENA, A.R.; KOBLITZ, M.G.B.; NETO, A.G.; UETANABARO, A.P.T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, v. 35, p. 91-98. 2006.

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

SILVA, D.J.P. **Sistema de gestão ambiental para a indústria de laticínios**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2011a.

SILVA, D.J.P. **Resíduos na indústria de laticínios**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2011b. Disponível em: <<https://www2.cead.ufv.br/sgal/files/apoio/saibaMais/saibaMais2.pdf>> Acesso em: 21 de novem. 2016.

SILVA, L.V.C.; ANDRADE, M.V.; RODRIGUES, K.; MARINHO, G. Tratamento de efluente sintético de laticínio em reatores em batelada inoculados com *Aspergillus niger* AN400. **Eng Sanit Ambient**, v.18, n.4, p. 371-380, out/dez 2013a.

SILVA, J.N.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Application of Home-Made Enzyme and Biosurfactant in the Anaerobic Treatment of Effluent with High Fat Content. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 3, p. 139-143, 2013b.

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

TELES, F.R.R.; CABRAL, J.M.S.; SANTOS, J.A.L. Enzymatic degreasing of a solid waste from the leather industry by lipases. **Biotechnol**, v. 23, 1159-1163. 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.I. **Microbiologia**, 10<sup>a</sup>. ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, J.V. A review on microbial lipases production **Food Bioprocess Technol**, v. 3, p. 182–196, 2010.

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 2<sup>o</sup> ed. Santa Maria: Ed da UFSM, 2003. 192p.

VILELA, M.L. **Tratamento biológico do resíduo da indústria de sorvetes por *Zygomycetes***. Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Lodos Ativados**. 2<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, v.4, 416 p, 1997.

VULFSON, E.N. **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application**. Woolley, P.; Petersen, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain, v.178, p. 271-288, 1994.

YAHYA, A.R.M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme Microb Technol**, v. 23, p. 438-450, 1998.

ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. In: \_\_\_\_\_. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 4ª ed., São Paulo, vol. 1, p. 104-850, 2008.