



MIRIAN LIMA VILELA

**TRATAMENTO BIOLÓGICO DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA DE SORVETES
POR ZYgomycetes**

RECIFE

FEVEREIRO/2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

MIRIAN LIMA VILELA

**TRATAMENTO BIOLÓGICO DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA DE SORVETES
POR ZYgomycetes**

MIRIAN LIMA VILELA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área: Fungos de Interesse Industrial

Orientador (a): NORMA BUARQUE DE GUSMÃO

Coorientador: EDELVIO DE BARROS GOMES

RECIFE

FEVEREIRO/2012

**TRATAMENTO BIOLÓGICO DO RESÍDUO DA INDÚSTRIA DE SORVETES
POR ZYGOMYCETES**

MIRIAN LIMA VILELA

Data da defesa: 09/03/2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco

Deus não escolhe os capacitados,
capacita os escolhidos. Fazer ou não
fazer algo só depende de nossa
vontade e perseverança.

Albert Einstein

Agradecimentos

Agradeço ao meu 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.

Agradeço aos meus queridos pais Juracy Rodrigues Vilela e Ariete Lima Vilela pelo carinho, paciência, compreensão e apoio que me deram, desde os primeiros passos de minha vida.

Agradeço ao meu amor, amigo e companheiro, de hoje e sempre, Antônio Mendes Ferreira pelo grande incentivo para que eu chegasse até aqui, pelo seu amor e apoio nas etapas finais deste trabalho, pois não sabia o quanto me amava.

Agradeço a minha querida orientadora professora doutora Norma Buarque de Gusmão pelos ensinamentos, orientação, compreensão, paciência, conselhos, incentivo, apoio e dedicação em todos os momentos dessa etapa de minha vida.

Agradeço ao meu querido Coorientador professor doutor Edélvio de Barros Gomes pela preocupação com os resultados do trabalho e pelos e-mails descontraídos que me passava, para amenizar a tensão e a ansiedade.

Agradeço as professoras doutoras Cristina Maria de Souza Motta e Galba Maria de Campos Takaki por terem aceitado a participar da banca.

Agradeço a minha colega e doutoranda Minelle Sousa, bem como a Odacy Camilo por terem me ajudado na etapa das atividades de lipase, realizada na Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Agradeço a todos os professores, ministrantes das aulas do curso de Mestrado em Biologia de Fungos, pelos ensinamentos transferidos.

Agradeço ao meus colegas e companheiros de caminhada do curso de mestrado, em especial as minhas colegas de trabalho no laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos Mariana, Maria Juliana e Georgia, bem como a doutora Rita Maria, esposa do meu co-orientador, e ao querido casal Darne e Glória por terem transferido alguns dos seus conhecimentos práticos no início do desenvolvimento desse trabalho, bem como a Rosilma, Flávia, Erick, Pérsio, Maira, Diana, Amanda, Nelânia e outros pela atenção e solidariedade nos momentos em que precisei.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, em especial aos da Micologia Médica, professores doutores Rejane Pereira Neves, Oliane Maria Correia Magalhães e Professor Armando Marsdem Lacerda por terem me acolhido no Laboratório de Micologia Médica, sendo os meus alicerces no aprendizado da Micologia.

Agradeço as professoras do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, onde foi desenvolvido o meu trabalho, pelo apoio e amizade em algum momento difícil que passei, em especial a professora doutora Janete Magali de Araújo.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Antibióticos pela ajuda e incentivo, em especial a Maria de Fátima e Orlando.

Agradeço aos meus colegas e companheiros do Departamento de Antibióticos, em especial os da Coleção de Cultura como Diego, Emerson, Luana, Cyntia, Ivana, Erica, Eliz e tantos outros pela ajuda muitas vezes dispensada e pelos momentos de descontração, devido estarmos trabalhando sempre juntos nos finais de semana, feriados e noites, em busca de um mesmo objetivo.

Agradeço aos poucos colegas da Companhia Brasileira de Trens Urbanos – CBTU, meu trabalho secular, por terem sido compreensivos, valorizando o meu esforço, e pelo incentivo para não desistir, apesar de não estarem envolvidos com a área de pesquisa.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Tecnologia de Pernambuco, por cooperarem com os resultados da minha pesquisa, realizando as análises físico-químicas do material objeto de estudo, em especial Marcelo e Tatiana do Labtam, Claudinha da recepção e o funcionário Izeldo, pela preocupação na agilidade da entrega dos resultados.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa, durante os primeiros meses de desenvolvimento do projeto.

Agradeço a PROPESQ pela ajuda de custo dispensada para a realização da caracterização e análise físico-química do material objeto de estudo, para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a Indústria de Sorvetes que forneceu o resíduo sólido do seu efluente para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco, junto ao programa de Biologia de Fungos, e aos Departamentos de Micologia e Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas, pelo desenvolvimento desse trabalho na intenção de contribuir com a instituição, com o bem estar social e com o meio ambiente.

RESUMO

Devido a grande necessidade de reduzir danos ambientais, pelo descarte de resíduos da indústria alimentícia, objetivou-se tratar biologicamente o efluente sólido do efluente de uma indústria de sorvetes, localizada na região metropolitana do Recife, PE, Brasil, utilizando os gêneros *Mortierella*, *Cunninghamella* e *Mucor*, pertencentes à classe Zygomycetes, ordem Mucorales, por possuírem grande capacidade de resistência aos altos índices de contaminação, de acordo com a literatura, produzindo enzimas biocatalíticas. As 19 linhagens pertencem a Coleção de Cultura URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco foram submetidas aos ensaios de capacidade de crescimento nas concentrações 5, 10 e 15% do resíduo; diminuição da Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), consumo de nitrogênio, potássio e fósforo e produção de lipases. Inicialmente as linhagens foram selecionadas pela capacidade de crescerem em placas de Petri, contendo meio ágar água destilada, acrescido de 15% (m/v) do resíduo de sorvete. Depois foram realizados os ensaios em caldo resíduo de sorvete (15% m/v), com 17 dias de cultivo, para avaliação da biodegradabilidade e um controle abiótico. As linhagens *Cunninghamella elegans* URM6017 e URM5780 mostraram-se mais eficientes com a diminuição de 98,98% e 98,09 de DQO e 98,59% e 97,08 de DBO, respectivamente. Enquanto que no controle abiótico ocorreu uma diminuição de 92,49% de DQO e 92,57% de DBO e o nitrogênio de 20,83% e potássio de 98,02%. A linhagem URM 6017 apresentou um consumo de 66,07% de nitrogênio total e 99,85% de potássio. Durante o experimento os valores de pH variaram de 4,97 para o controle abiótico a 7,51 para URM6017 e de 6,92 para URM5780, ao final do processo. A atividade lipolítica das linhagens URM6017 foi de 2,01 U/mL utilizando como substrato o resíduo de sorvete e de 4,61 U/mL com o resíduo de sorvete adicionado de azeite de oliva e para a URM5780 foi de 2,73 U/mL e 3,84 U/mL, respectivamente. Das 19 linhagens estudadas, duas linhagens de *Cunninghamella elegans* URM6017 e URM5780 mostraram-se eficientes na redução da matéria orgânica contida no resíduo de sorvete.

Palavras-chave: *Cunninghamella elegans*; Resíduo sólido; Fermentação; Lipase

ABSTRACT

It is due to the great necessity of reducing the environmental damages, caused by the deploying of chemical residues from the Food Industry, It was aimed to treat biologically the solid effluent from an Ice cream factory, located in metropolitan region of Recife, PE, Brasil, using the genres *Mortierella*, *Cunninghamella*, and *Mucor*, belonging to the class of the Zygomycetes, order of Mucorales, for having a large capacity of resistance and high levels of contamination, according to the literature, producing biocatalytic enzymes. The 19 lineages belong to the Coleção de Cultura URM of the Departamento de Micologia da Federal de Pernambuco were undergone test of growth capacity at the concentrations of 5, 10, and 15% of the residue; Decreasing of the Chemical Oxygen Demand (COD) and Biochemical Oxygen Demand (BOD), nitrogen consumption, potassium and phosphorus and lipase production. Initially the lineages were selected by their capacity of growing onto Petri dishes, containing a half agar of destillate water, plus 15% (m/v) of the ice cream residue. After that were performed tests into ice cream residual broth (15% m/v) with 17 of cultivation for assessing the biodegradability and an abiotic control. The lineages *Cunninghamella elegans* URM6017 and URM5780 presented as more efficient with the decrease of 98,98% and 98,09 of COD and 98,59% and 97,08 of BOD, respectively. While in the abiotic control occurred a decrease of 92,49% of DQO and 92,57% of BOD and the nitrogen of 20,83% and potassium of 98,02%. The lineage URM6017 presented a consumption of 66,07% of total nitrogen and 99,85% of potassium. During the experiment the values of pH oscilated from 4,97 for the abiotic control to 7,51 for URM6017 and of 6,92 for URM5780 in the end of the process. The lipolytic activity of the lineages URM6017 was 2,01 U/mL using as substratum the solid residue of the ice cream, and 4,61 U/mL with the ice cream residue added the olive oil, and for URM5780 it was 2,73 U/mL and 3,84 U/mL, respectively. From the 19 testes lineages, two lineages of *Cunninghamella elegans* URM6017 and URM5780 showed themselves to be efficient in the organic matter decreasing contained in the ice cream residue.

Key words: *Cunninghamella elegans*; Solid Residue; Fermentation; Lipase

LISTA DE ABREVIATURAS

- USD – Dólar dos Estados Unidos
kDa – Unidade de Massa Atômica
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
pH - Potencial hidrogeniônico
DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO - Demanda Química de Oxigênio
OD - Oxigênio Dissolvido
COT - Carbono Orgânico Total
O&G - Óleos e Graxas
N – Nitrogênio
P - Fósforo
MO - Matéria Orgânica
NKT - Método de determinação de Nitrogênio Kjeldahl Total
K - Potássio
ETE - Estação de Tratamento de Efluentes
ITEP - Instituto de Tecnologia de Pernambuco
UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor
MEA - extrato de malte
BDA - Meio batata ágar dextrose
(m/v) – massa por volume
RS – Resíduo sólido
URM – Unidade de Micologia do Recife
FS – Fermentação Submersa
FES – Fermentação em Estado Sólido
ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
AG – Ácido graxo
U - $\mu\text{molAG}/\text{mL}\cdot\text{min}$

LISTA DE FIGURAS

4.1. Coleta do resíduo do efluente da indústria de sorvetes	42
FIGURA 1. Estação de Tratamento de Efluente da indústria de sorvetes. A. Tanque de recepção do efluente; B. Vista parcial dos 8 tanques de decantação; C. Transferência do resíduo para tanques de secagem; D. Tanque de secagem (seta amarela) do resíduo sólido e os biorreatores do tipo UASB (seta branca).	43
4.3.1. Condições de crescimento de zygomycetes em concentrações de resíduo do efluente de sorvete para o seu posterior tratamento	45
FIGURA 2. Transferência do micro-organismo para placa de Petri contendo o meio ágar resíduo sólido (5, 10 e 15% m/v) da indústria de sorvetes. A. Perfurando com “furador de rolha”; B. Transferência para placa de Petri; C. Colocação no ponto central da placa de Petri.	45
4.4.2. Determinação da atividade lipásica	46
FIGURA 3. Amostra da titulação com NaOH e HCl a 0,025 M, com o auxílio de uma bureta automática marca Aptilab.	47
5.2. Seleção de crescimento das linhagens de Zygomycetes em meio contendo resíduo do efluente de sorvete	49
FIGURA 4. <i>Cunninghamella elegans</i> URM6017 (A) e <i>C. elegans</i> URM5780 (B) com 3 dias de crescimento em meio contendo 15% (m/v).	50
5.3. Características microscópicas das linhagens selecionadas	50
FIGURA 5. Características microscópicas das linhagens selecionadas. A. Micélio contendo esporangióforos, esporângios e milhares de esporangiósporos liberados por <i>C. elegans</i> 6017; B. Esporangióforo contendo um esporângio liberando esporangiósporos por <i>C. elegans</i> 5780.	50

**5.4. Determinação das análises físico-químicas do efluente tratado pela linhagem
Cunninghamella elegans URM6017** 51

FIGURA 6. Desenvolvimento da linhagem *C. elegans* URM6017 em frascos de Ferhembach, após 17 dias de tratamento. 51

LISTA DE TABELAS

3.1.1. Efluente da indústria de sorvetes	19
Tabela 1. Fontes de lipídios e suas concentrações em águas residuárias	20
3.3.1.1. Demanda Bioquímica de Oxigênio	23
Tabela 2. Concentrações e contribuições unitárias típicas de DBO _{5,20} de efluentes industriais	25
4.3. Procedência e manutenção dos micro-organismos	44
Tabela 3. Lista dos Zygomycetes cedidos pela micoteca URM – Universidade Federal de Pernambuco	44
5.1. Caracterização do resíduo do efluente da indústria de sorvetes	48
Tabela 4. Resultados da caracterização do resíduo do efluente de sorvete	48
5.2. Seleção de crescimento das linhagens de Zygomycetes em meio contendo resíduo do efluente de sorvete	49
Tabela 5. Crescimento do diâmetro da colônia das linhagens de Zygomycetes em MEA e em meio sólido contendo diferentes concentrações do resíduo do efluente da indústria de sorvetes (5, 10 e 15% m/v)	49
5.4. Determinação das análises físico-químicas do efluente tratado pela linhagem <i>Cunninghamella elegans</i> URM6017	51
Tabela 6. Análises físico-químicas do resíduo do efluente tratado pela linhagem <i>C. elegans</i> URM6017	51
Tabela 7. Avaliação da eficiência do efluente tratado pela linhagem <i>C. elegans</i> URM6017 com relação ao controle abiótico	54
5.5. Avaliação da atividade lipolítica das linhagens selecionadas e características físico-químicas do resíduo da indústria de sorvetes	54

Tabela 8. Atividade de lipase em U/mL por <i>C. elegans</i> URM 5780 e URM6017 em meios de cultura contendo resíduo de sorvete e resíduo de sorvete adicionado de óleo de oliva como nutrientes	55
Tabela 9. Características físico-químicas do fermentado das linhagens <i>C. elegans</i> URM6017 e <i>C. elegans</i> URM5780 com 17 dias de crescidas no efluente de sorvete, com e sem adição de azeite de oliva como fonte nutricional	57
Tabela 10. Percentual de eficiência (%) do tratamento do resíduo da indústria de sorvetes, utilizando azeite de oliva como indutor, com relação à caracterização do efluente	58
Tabela 11. Percentual de eficiência (%) do tratamento do resíduo da indústria de sorvetes, utilizando azeite de oliva como indutor, com relação aos controles abióticos	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. Processo na indústria de sorvetes	19
3.1.1. Efluente da indústria de sorvetes	19
3.2. Estação de tratamento de Efluentes (ETE)	21
3.2.1. Resíduos sólidos industriais	22
3.3. Matéria orgânica contida nos efluentes industriais	23
3.3.1. Importância das Demanda Bioquímica e Demanda Química de Oxigênio (DBO e DQO) da Indústria de Laticínios	23
3.3.1.1. Demanda Bioquímica de Oxigênio	23
3.3.1.2. Demanda Química de Oxigênio	25
3.3.1.3. Relação DQO/DBO	26
3.4. Importância da coleta e caracterização de efluentes industriais para avaliação da carga poluidora	26
3.5. Métodos aplicados a cada etapa de tratamento de efluentes com elevada taxa de lipídios	27
3.5.1. Métodos Físicos de Tratamento	27
3.5.2. Métodos Químicos de Tratamento	28
3.5.3. Métodos Biológicos de Tratamento	29
3.5.3.1. Processo aeróbio	29
3.5.3.2. Processo anaeróbio	29
3.6. Legislação brasileira para o lançamento de efluentes contendo alto teor de lipídios	30
3.7. Produção de lipase por <i>Cunninghamella</i> (Matr. 1903)	32
3.8. Metabolismo dos fungos	34
3.8.1. Metabolismo dos Lipídios	34
3.9. Lipases	35

3.10. Subprodutos gerados pela biocatálise hidrolítica de ligações éster-carboxílicas e suas importâncias	38
3.10.1. Ácidos graxos	38
3.10.1.1. Ácidos graxos saturados	40
3.10.1.2. Ácidos graxos insaturados	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Coleta do resíduo do efluente da indústria de sorvetes	42
4.2. Caracterização físico-química do resíduo do efluente de sorvete	43
4.3. Procedência e manutenção dos micro-organismos	44
4.3.1. Condições de crescimento de zygomycetes em concentrações de resíduo do efluente de sorvete para o seu posterior tratamento	45
4.3.2. Crescimento em larga escala	45
4.4. Produção de lipase	46
4.4.1. Condições de crescimento	46
4.4.2. Determinação da atividade lipásica	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Caracterização do resíduo do efluente da indústria de sorvetes	48
5.2. Seleção de crescimento das linhagens de Zygomycetes em meio contendo resíduo do efluente de sorvete	49
5.3. Características microscópicas das linhagens selecionadas	50
5.4. Determinação das análises físico-químicas do efluente tratado pela linhagem <i>Cunninghamella elegans</i> URM6017	51
5.5. Avaliação da atividade lipolítica das linhagens selecionadas e características físico-químicas do resíduo da indústria de sorvetes	54
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

As indústrias de sorvete, que são derivadas das indústrias de laticínios, contêm em seus despejos quantidades variáveis de leite diluído e sólidos flutuantes (principalmente substâncias graxas de variadas fontes), apresentando elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e sólidos suspensos (NAIME; GARCIA, 2005).

Nutrientes como nitrogênio e fósforo, presentes no leite, são considerados essências para os tratamentos biológicos, contudo, quando gerados em grandes quantidades em processadoras de laticínios se constituem poluentes inorgânicos, ocasionando a extração desse tipo de efluente, o qual possui cerca de 3% de proteínas e 1.000 mg.L^{-1} de fósforo e pode vir a causar a eutrofização dos rios (BRUM et al., 2009).

A introdução de compostos poluentes na água por parte da indústria, como matéria orgânica traduzida em demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), pH, gordura, fosfatos, entre outros que prejudicam o meio ambiente e a saúde animal, torna potencial a necessidade de tratamento dos seus despejos, com a finalidade de reduzir os efeitos devastadores decorrentes da poluição (NIREMBERG et al., 2005).

As indústrias de laticínios, em especial as de grande porte, descarregam grandes quantidades de resíduos no meio ambiente que, na maioria das vezes, não passam por um tipo de tratamento específico. Esses resíduos têm grande variabilidade que depende da água utilizada, do tipo de processo e do controle exercido sobre suas várias descargas. Essas indústrias produzem uma grande quantidade de produtos, abrangendo desde o processamento do leite até uma complexa flexibilidade de multiprodutos, como queijos, requeijão, creme de leite, doces, sorvetes, iogurtes, leite em pó, leite condensado, entre outros (NIREMBERG et al., 2005).

O problema torna-se ainda mais agravante se for considerado que 90% das empresas de laticínios, que funcionam no país, são de pequeno e médio portes, e não possuem quadro qualificado para lidar com as mudanças inerentes a implementação de tecnologias mais limpas, nem com a operação de sistemas de tratamento dos seus efluentes (MENDES e CASTRO, 2004).

Este setor é de grande importância para economia mundial, e tem colocado o Brasil como o sétimo maior produtor. Entretanto, as indústrias de laticínios têm convivido com o consumo excessivo de água nos processos de higienização, representando mais de 80% da

água utilizada nas etapas de processamento da mesma. Esta água, em indústrias agrícolas, é tratada em sistema de tratamento de efluentes, cujo objetivo é a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais (BRUM et al., 2009).

As condições de processamento e as etapas de operação são fatores que determinam como devem ser tratados esses efluentes (MENDES et al., 2005).

Esgotos tratados em reatores anaeróbios e em processos convencionais de lodos ativados, que utilizam filtros biológicos e outros processos, também podem contaminar fontes de água utilizadas para abastecimento público, uso recreacional, irrigação de culturas, dessedentação de animais, ou fontes mais nobres como as de abastecimento público e irrigação de hortaliças ou de produtos ingeridos crús ou com casca, cujo requisito de qualidade microbiológica desses efluentes passa a ter uma maior importância (<http://www.finep.gov.br/prosab/livros/prosabCarlos/cap-7.pdf>).

Os efluentes industriais para serem descartados em corpos receptores, devem obedecer aos padrões estabelecidos por um órgão de legislação ambiental competente, seja nos âmbitos federal, estadual ou municipal (RESOLUÇÃO CONAMA nº 357 de 2005).

Com a finalidade de que seja adotado um maior rigor nos padrões de despejo de águas resíduárias, a fim de que haja uma redução dos impactos ambientais, existe uma motivação para o desenvolvimento de pesquisas, especialmente para os efluentes que contêm elevados teores de lipídios, principalmente os gerados por indústrias de laticínios, abatedouros, avícolas, enlatados, extração de óleos, e outras. A Política Nacional dos Recursos Hídricos, instituída pela Lei Federal nº 9.433, de 8 de janeiro de 1997, trata da cobrança pelo uso dos corpos d'água para o lançamento de despejos líquidos industriais (MENDES et al., 2005).

A etapa de caracterização dos efluentes deve ser considerada como uma tarefa básica e indispensável, a fim de que o problema de tratamento seja adequadamente equacionado, através da obtenção de informações e de como essas são obtidas, para a adoção de métodos físicos, químicos e biológicos inerentes a sua composição e vazão (PEREIRA et al., 2004).

De acordo com Tocchetto (2008), nos procedimentos de avaliação da eficiência são analisados os parâmetros de DBO, DQO, sólidos sedimentáveis e voláteis, entre outros, tendo como objetivo oferecer subsídios para estudos preliminares de projetos de tratamento de efluentes, brutos e clarificados, para que posteriormente seja calculada a eficiência de remoção desses em percentagem.

Tendo em vista que vários micro-organismos são tidos como bons produtores de lipases, há a realização de estudos sobre a utilização desses em diferentes substratos em meios sólidos, cuja finalidade é encontrar combinações ideais para a obtenção de lipases com altos rendimentos, de modo a reduzir os custos do processo de produção em escala industrial. (VARGAS, 2004).

Fungos da classe Zygomycetes, especialmente da ordem Mucorales, possuem habilidade em metabolizar compostos xenobióticos. Um exemplo é *Cunninghamella elegans* que, de acordo com a literatura, possue habilidades para oxidar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e compostos de petróleo. Outros gêneros como *Mucor*, *Rhizopus* e *Syncephalastrum* possuem habilidades para atuar na biossorção de Cobre, Cádmio e Zinco sob as formas de micélio vivo e micélio morto, utilizando a biomassa como elemento de sorção (SOUZA, 2004).

Deste modo, torna-se necessário um pré-tratamento desses efluentes através do uso de enzimas, particularmente lipases, sendo considerado como uma técnica bastante promissora, cuja finalidade é reduzir o tempo de retenção na digestão anaeróbia, minimizando os impactos ambientais (MENDES et al., 2005).

As lipases apresentam uma importância particular por hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, sendo de relevante importância para o tratamento de efluentes com alto teor de gorduras (MENDES et al., 2005).

Portanto, o tratamento com enzimas nos despejos industriais foi proposto desde 1930 e, recentemente, vem sendo intensamente utilizado. Essas apresentam grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos e nas indústrias química e farmacêutica. Há estimativas que cerca de 25.000 enzimas estão presentes na natureza, 2.800 foram classificadas e perto de 400 são comercializadas (VASCONCELOS et al., 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o potencial de espécies de Zygomycetes, ordem Mucorales, para tratar o efluente sólido da indústria de sorvetes.

2.2. Específicos

- Caracterizar o efluente sólido da indústria de sorvete quanto aos parâmetros de pH, demanda química de oxigênio, demanda bioquímica de oxigênio, carbono orgânico total, nitrogênio total Kjeldahl, óleos e graxas total, potássio total e fósforo total;
- Selecionar Zygomycetes com capacidade de crescimento em meios contendo o resíduo sólido do efluente da indústria de sorvetes;
- Detectar a produção de lipase por espécies de Zygomycetes em meio contendo efluente sólido de sorvete;
- Quantificar a produção de lipase por fungos crescidos em meio contendo efluente sólido de sorvete;
- Verificar o consumo do efluente sólido de sorvete pelos Zygomycetes selecionados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Processo na indústria de sorvetes

Na indústria de sorvete ocorrem as etapas de processamento do leite, juntamente com açúcar e aditivos, para a sua padronização, havendo consumo de água, energia e embalagens, gerando efluentes e ruídos. Após a etapa anterior, ocorre a mistura e, logo em seguida, ocorrem as etapas de pasteurização e homogeneização, havendo em ambas as etapas o consumo de energia e combustível, gerando emissão atmosférica, calor, ruído e resíduos. Nas etapas seguintes, ocorrem o resfriamento rápido, contendo a presença de ingredientes sensíveis ao calor; a maturação e o batimento, havendo consumo de água, energia e ingredientes; a embalagem e o acondicionamento, consumindo energia e embalagens; o congelamento final e o endurecimento, havendo consumo de água e energia, sendo gerados, em todas essas etapas, efluentes, resíduos e ruídos. Por último, seguem-se as etapas de armazenamento e distribuição do sorvete (Guia técnico ambiental de produtos lácteos - série P+L, 2006).

3.1.1. Efluente da indústria de sorvetes

Nas estações de tratamento da indústria de sorvetes, a elevada concentração de triacilgliceróis necessita inicialmente ser hidrolisada para, em seguida, ser transformada em fonte de carbono para micro-organismos e, posteriormente, ser convertido em lodo ativado (DUEHOLM et al., 2001; MENDES et al., 2005).

Os detergentes (hidróxido de sódio, metassilicato de sódio) e desinfetantes (hipoclorito de sódio, clorhexidina, compostos quaternários de amônio), como também os compostos associados ao leite, como gorduras, proteínas e carboidratos contribuem para a composição dos efluentes das indústrias de laticínios, de forma que para a degradação de 1 kg de gordura são necessários 3 kg de DQO, para 1 kg de lactose é necessário 1,13 kg de DQO e para 1 kg de proteína é necessário 1,36 kg de DQO. Além disso, dependendo da linha de produção, o efluente pode conter pedaços de frutas, essências, e outros produtos que podem contribuir com o aumento da matéria orgânica, sendo claramente perceptível a extrema variação das características físico-químicas desse tipo de efluente (ALBERTON, 2009).

Lipídios contidos em efluentes, em especial os da indústria de laticínios, são causadores de grandes danos ao meio ambiente, pois formam filmes oleosos nas superfícies dos corpos de água, impedindo a passagem dos raios solares e a difusão do oxigênio do ar, promovendo a mortandade dos seres vivos que se encontram nesse meio. Sua fração é caracterizada por óleos, graxas, gorduras e ácidos graxos livres e, junto a outros nutrientes, constituem os principais compostos orgânicos de águas residuárias dessas indústrias (MENDES et al., 2005).

A Tabela 1 mostra as concentrações de lipídios (mg/L) contidos em águas residuárias com suas principais fontes geradoras.

Tabela 1. Fontes de lipídios e suas concentrações em águas residuárias

Tipos de Efluentes	Concentrações de lipídios (mg/L)
Doméstico	40-100
Matadouros e avícolas	Acima de 500
Laticínios	4.680
Restaurantes	98
Azeite de oliva	16.000
Sorvetes	845

Fonte: Mendes et al., 2005; Dors, 2006

Através do tratamento biológico dos efluentes líquidos contendo alto teor de lipídios em biorreator, torna-se necessário a transformação desses em lodo ativado para estimular o crescimento de micro-organismos filamentosos que são importantes na remoção de nutrientes como fósforo e nitrogênio promovendo, dessa forma, a sustentação do lodo formado, uma vez que esses lipídios contribuem com 30 a 40% da matéria orgânica contida nesses tipos de efluentes (MENDES et al., 2005).

Os fungos não são muito frequentes em sistemas de lodos ativados, aparecendo quando as condições do ambiente lhes são propícias, como baixos valores de pH, despejo rico em carboidratos e deficiência de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo. Com a baixa concentração desses micro-organismos, a probabilidade de formação de grânulos

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

maiores de lodo é reduzida, gerando sua flotação (MENDES et al., 2005; ALBERTON, 2009).

Finalmente, ressalta-se o emprego crescente da enzima lipase na limpeza de filmes gordurosos e no pré-tratamento de efluentes contendo elevados teores de lipídeos (MENDES et al., 2005).

3.2. Estação de tratamento de Efluentes (ETE)

Uma estação de tratamento de efluentes é composta de águas utilizadas diretamente nas etapas do processo industrial como em lavagem de máquinas, tubulações e pisos, águas de sistemas de resfriamento e geradores de vapor, ou incorporadas aos produtos e esgotos sanitários. Os efluentes líquidos ao serem despejados com os seus poluentes característicos causam a alteração da qualidade dos corpos receptores e, consequentemente, a sua poluição. O fato preocupante é o aumento, tanto das populações, quanto das atividades industriais e o número de vezes que um mesmo rio recebe dejetos urbanos e industriais concomitantemente, e segue servindo como manancial para as próximas cidades ribeirinhas. A poluição se origina das perdas com energia, produtos e matérias primas, por motivo da ineficiência dos processos industriais, devendo-se inicialmente ser controlada pela redução dessas perdas durante os seus processamentos, incluindo a utilização de processos mais modernos e arranjo geral otimizado, a fim de reduzir, principalmente, o consumo de água em lavagens de equipamentos e pisos, a perda de produtos durante descarregamento e matérias primas, evitando o lançamento direto desses na rede coletora. Após a otimização dos processos industriais, as perdas devem ser controladas pela utilização de sistemas de tratamento de efluentes (GIORDANO, 2004).

Uma estação de tratamento de efluentes não deve gerar incômodos pela apresentação de ruídos ou odores, nem causar impactos visuais negativos. A indústria também deve tratar os seus esgotos sanitários, para evitar a sobrecarga no sistema público. O ritmo produtivo deve ser conhecido, incluindo os horários dos turnos de trabalho, as operações com limpeza e manutenção e todo o seu processo. O ponto fundamental é compatibilizar a produção industrial com a conservação do meio ambiente, de modo que a eficiência da indústria se torne o primeiro passo para a eficiência ambiental (GIORDANO, 1999; GIORDANO, 2004).

Nesse sentido, indústrias, consultores autônomos, empresas de consultoria, universidades e centros de pesquisa mantêm suas equipes envolvidas, direta ou indiretamente, com simulações e estudos de fluxo de água em processos produtivos. O próprio governo federal, através da oferta de recursos a fundo perdido, incentiva a formação de parcerias entre o setor produtivo e as universidades, para que possa atender à crescente demanda tecnológica. Nestas parcerias, a indústria desembolsa parte dos seus recursos para comprovar o seu real interesse naquilo que pretende desenvolver (<http://ecocell.com.br/PDF/Artigo01.pdf>).

3.2.1. Resíduos sólidos industriais

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, os resíduos sólidos industriais são todos os resíduos que se encontram no estado sólido ou semi-sólido, resultantes das atividades industriais, incluindo lodos e determinados líquidos, cujas características os tornem inviáveis para o lançamento na rede pública de esgotos ou corpos d'água, ou que exijam soluções técnicas e economicamente viáveis, antes de serem descartados. O aterro industrial é uma das alternativas de destinação desses resíduos sólidos que, quando a indústria se utiliza de técnicas que permitem a disposição controlada desses no solo, acaba por não causar grandes danos ou riscos à saúde pública, minimizando, dessa forma, os impactos ambientais. Por motivo da diversidade destes materiais, não existe um processo de tratamento pré-estabelecido, havendo sempre a necessidade da realização de pesquisas em prol do desenvolvimento de processos economicamente viáveis. Todavia, é comum proceder ao tratamento desses resíduos com vistas a sua reutilização ou a sua inertização. A reciclagem desses resíduos é um exemplo, tratando de transformar-los em matéria-prima, gerando economia para o processo industrial. Isto requer grandes investimentos com retorno imprevisível, uma vez que é limitado o repasse dessas aplicações no preço final dos produtos, porém o risco se reduz, à medida que o desenvolvimento tecnológico abre caminhos mais seguros e econômicos para o seu aproveitamento (http://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/3668-resduos-solidos-industriais).

3.3. Matéria orgânica contida nos efluentes industriais

A matéria orgânica contida na fração de sólidos voláteis, normalmente, é medida de forma indireta pelas demandas bioquímica de oxigênio (DBO) e química de oxigênio (DQO). A DBO mede a quantidade de oxigênio necessário para que os micro-organismos degradem a matéria orgânica biodegradável. A DQO é a medida da quantidade de oxigênio necessário para oxidar quimicamente a matéria orgânica biodegradável ou não. A matéria orgânica ao ser biodegradada nos corpos receptores causa um decréscimo na concentração do oxigênio dissolvido (OD), contido no meio hídrico, deteriorando a qualidade ou inviabilizando a vida aquática. Também pode ser medida pela quantidade de carbono orgânico total (COT), principalmente em águas limpas e em efluentes para reuso (GIORDANO, 2004).

Os óleos e graxas estão comumente presentes nos efluentes tendo as mais diversas origens como restaurantes industriais, oficinas mecânicas, casas de caldeira, equipamentos que utilizam óleo hidráulico e matérias primas com composição oleosa como gordura de origem vegetal, animal ou mineral (GIORDANO, 2004).

O nitrogênio e o fósforo são elementos presentes nos esgotos sanitários e em efluentes industriais e são essenciais às diversas formas de vida e, quando em excesso causa problemas como a eutrofização, devido à proliferação de plantas aquáticas nos corpos receptores (GIORDANO, 2004).

O potencial hidrogeniônico (pH) indica o caráter ácido ou básico dos efluentes. Nos tratamentos de efluentes o pH é um parâmetro fundamental para o controle do processo (GIORDANO, 2004).

3.3.1. Importância das Demanda Bioquímica e Demanda Química de Oxigênio (DBO e DQO) da Indústria de Laticínios

3.3.1.1. Demanda Bioquímica de Oxigênio

Demandas Bioquímica de Oxigênio é a quantidade de oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica por decomposição microbiana aeróbia para uma forma inorgânica estável, como também é um parâmetro indispensável nos estudos de caracterização de esgotos sanitários e de efluentes industriais. É, normalmente considerada como a

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

quantidade de oxigênio consumido durante um determinado período de tempo - 5 dias - a temperatura de incubação específica - 20°C - por isso DBO^{5,20}. Os maiores aumentos em termos de DBO, num corpo d'água, são provocados por despejos de origem predominantemente orgânica (CETESB, 2001).

Dentre as atividades industriais, o setor de alimentos se destaca por ter um maior consumo de água e uma maior geração de efluentes por unidade produzida, além de gerar um grande volume de lodo nas estações com tratamento biológico (RAMJEAWON, 2000; <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/II-018.pdf>).

A indústria de laticínios é um exemplo desse setor, onde as operações de limpeza de silos, tanques, pasteurizadores, homogeneizadores, tubulações, e outros, geram um grande volume de efluente com uma elevada carga de matéria orgânica. Esta carga é constituída basicamente de leite (tanto da matéria-prima, quanto de seus derivados) e reflete em um efluente com elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), óleos e graxas, nitrogênio, fósforo, entre outros nutrientes (<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/II-018.pdf>).

A Demanda Bioquímica de Oxigênio total está relacionada diretamente a perdas de leite, constituindo sua presença em um percentual entre 90% – 94% no efluente, chegando a representar 2% do volume total processado na indústria de laticínios (WASTEWATER, 1999; <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/II-018.pdf>).

A presença de um alto teor de matéria orgânica pode induzir ao completo esgotamento do oxigênio na água, provocando o desaparecimento de peixes e outras formas de vida aquática. Um elevado valor da DBO pode indicar um incremento da microflora e interferir no equilíbrio da vida aquática, além de produzir sabores e odores desagradáveis, podendo obstruir os filtros de areia utilizados nas estações de tratamento (CETESB, 2001).

A carga de DBO, expressa em Kg/dia, é um parâmetro de fundamental importância para os projetos das estações de tratamento biológico, resultando nas principais características dos sistemas de tratamento como áreas e volumes de tanques, potências de aeradores, entre outras (<http://www.brasilescola.com/quimica/demanda-quimica-oxigenio.htm>).

Quando uma substância apresenta alta recalcitrância são utilizados compostos químicos para torná-las degradáveis. Esse método é mais rápido que o da DBO, e tem duração de 2 a 3 horas, enquanto o da DBO equivale ao tempo de cinco dias. Geralmente,

no método químico é utilizado o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a quente, e para águas destinadas ao abastecimento público é utilizado o permanganato de potássio ($KMnO_4$) (<http://www.brasilescola.com/quimica/demanda-quimica-oxigenio.htm>).

A Tabela 2 mostra as concentrações e contribuições unitárias típicas de $DBO_{5,20}$ de efluentes industriais.

Tabela 2 - Concentrações e contribuições unitárias típicas de $DBO_{5,20}$ de efluentes industriais

Tipo de Efluente	Concentração $DBO_{5,20}$ (mg/L)		Contribuição Unitária de $DBO_{5,20}$ (kg/dia)	
	Faixa	Valor Típico	Faixa	Valor Típico
Esgoto sanitário	110-400	220	-	54 g/hab.dia
Celulose branqueada (processo Kraft)		300	29,2 a 42,7 kg/t	
Têxtil	250-600	-	-	-
Laticínio	1.000-1.500	-	1,5-1,8 kg/m ³ leite	
Abatedouro bovino	-	1.125	-	6,3 kg/1.000 kg Peso vivo
Curtume (ao cromo)	-	2.500	-	88 kg/t pele salgada
Cervejaria	-	1.718	-	10,4 kg/m ³ cerveja
Refrigerante	-	1.188	-	4,8 kg/m ³ refrigerante
Suco cítrico concentrado	-	-	-	2,0 kg/1000 kg laranja
Petroquímica	-		-	-
Açúcar e álcool		25.000		

Fontes: Braile & Cavalcanti e CETESB

De acordo com Mendes et al. (2005) os valores da DBO para águas residuárias de efluentes de laticínios, sem recuperação de soro de queijo, está entre 40-48.000 mg/L, sendo maior que o valor para efluentes de matadouros - 30.000 mg/L - sem recuperação de resíduos.

3.3.1.2. Demanda Química de Oxigênio

Demanda Química de Oxigênio (DQO) é a quantidade de oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica por meio de um agente químico e se constitue em um parâmetro indispensável, tanto quanto a DBO, para os estudos da caracterização de esgotos sanitários e de efluentes industriais (CETESB, 2001).

A DQO avalia a quantidade de oxigênio dissolvido (OD) o qual é consumido em meio ácido, levando, dessa forma, a matéria orgânica a se degradar, sendo essa biodegradável ou não, uma vez se diferenciando da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), a qual mede a quantidade de oxigênio que é necessária para ocorrer a oxidação da matéria orgânica biodegradável, tornando-se de extrema importância no controle de

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

degradação dos efluentes industriais (<http://www.brasilescola.com/quimica/demanda-quimica-oxigenio.htm>).

A DQO utilizada juntamente com a DBO torna-se muito importante, pois através delas é fácil observar a biodegradabilidade dos despejos (<http://www.mundoeducacao.com.br/quimica/demanda-quimica-oxigenio.htm>).

3.3.1.3. Relação DQO/DBO

O valor da DQO é superior ao da DBO e pode ser obtido no mesmo dia da coleta, servindo também para balizar as diluições, entretanto, deve-se observar que as relações DQO/DBO diferenciam-se para os diversos tipos de efluentes, e podem se alterar para um mesmo tipo de efluente, mediante tratamento biológico. Desta forma, um efluente bruto apresentando relação DQO/DBO igual a 3/1, poderá apresentar relação da ordem de 10/1 após tratamento biológico, atuando a DQO em maior extensão sobre a DBO (CETESB, 2001).

Esta relação pode indicar que tipo de oxidação atua sobre a matéria orgânica, durante a sua decomposição. Caso a relação DQO/DBO seja $< 2,5$ o efluente é considerado de fácil biodegradação. Estando o seu valor entre 5 e 2,5, haverá necessidade de se tomar cuidado quanto a escolha do tratamento biológico, a fim de que seja removida a quantidade de matéria que se deseja. Estando essa relação com um valor > 5 as chances de remoção são mínimas (JARDIM; CANELA, 2004)

3.4. Importância da coleta e caracterização de efluentes industriais para avaliação da carga poluidora

Para a avaliação da carga poluidora dos efluentes industriais e esgotos sanitários é necessário se fazer medições da vazão *in loco* e coleta de amostras, para que se analise diversos parâmetros sanitários que representem a carga orgânica e a carga tóxica dos efluentes. As técnicas de coleta são definidas a partir da matriz (águas, esgotos sanitários, efluentes industriais ou resíduos), e que por sua vez definem os parâmetros a serem analisados, os quais são também definidos pelos objetivos que se pretende atingir no tratamento, através da utilização dos resultados analíticos (GIORDANO, 2004).

As características dos efluentes industriais são inerentes a composição das matérias-primas, das águas de abastecimento e do processo industrial. Os principais constituintes orgânicos são proteínas, açúcares, óleos e gorduras, micro-organismos, sais orgânicos e componentes dos produtos saneantes (GIORDANO, 2004).

Necessita-se, contudo, que sejam analisados diversos parâmetros de controle em virtude dos diferentes tipos de poluentes lançados nos corpos receptores, utilizando-se, normalmente, os de natureza física, química e biológica, representantes da carga poluidora que definem o processo de tratamento e servem para dimensionar a estação de tratamento, atendendo ao programa de monitoramento estabelecido pela legislação ambiental. Logo, as amostras dos efluentes brutos servem para quantificar a carga poluidora e verificar a sua variabilidade, definindo o processo de tratamento e dimensionando os sistemas, através da avaliação da eficácia e eficiência (GIORDANO, 2004).

3.5. Métodos aplicados a cada etapa de tratamento de efluentes com elevada taxa de lipídios

São vários os métodos aplicados às etapas de tratamento de efluentes com elevados teores de lipídios:

3.5.1. Métodos Físicos de Tratamento

Os métodos físicos de tratamento abrangem a remoção de sólidos de dimensões relativamente grandes, de sólidos em suspensão, areias e lipídios. Para essa finalidade são utilizadas grades, peneiras simples ou rotativas, caixas de areia ou tanques de remoção de óleos e graxas, decantadores, filtros de areia. As grades destinam-se a reter sólidos grosseiros em suspensão e são utilizadas para a proteção de bombas, válvulas, entre outros equipamentos. Peneiras são dispositivos destinados à retenção de partículas mais finas. As caixas de areia destinam-se a retenção de detritos pesados e inertes em suspensão nas águas residuárias e são usadas para proteger bombas e tubulações contra abrasão e entupimento. Os tanques de decantação são empregados na separação de sólidos sedimentáveis contidos em águas residuárias (NAKHLA, 2003; MENDES et al., 2005).

Na remoção de lipídios em estado livre, geralmente, são utilizadas caixas de gordura que permitem a separação por retirada manual ou por meio de raspadores na superfície,

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

onde devem ser evitadas temperaturas superiores a 35°C e pH acima de 8,5 na alimentação das mesmas, para evitar a saponificação ou emulsificação, bem como o excesso de detergente que prejudica a eficiência da separação, devido a formação de gotículas menores com menor velocidade ascensional. A emulsificação é quebrada pela adição de produtos químicos e pela utilização de flotadores com ar dissolvido. No entanto, o processo de flotação apresenta custos operacionais elevados, além de gerar lodo químico que deve ter uma destinação adequada (MENDES et al., 2005).

3.5.2. Métodos Químicos de Tratamento

A necessidade de correção de pH decorre do processo da coagulação exigir valor ótimo, quando ocorre a formação dos flocos. Se o efluente for ácido, a correção poderá ser feita com alcalinizantes como soda cáustica, carbonato de sódio, amoníaco ou a cal que é o produto mais utilizado. No caso de efluentes muito ácidos, a cal deve ser adicionada em duas ou mais etapas (TOCCHETTO, 2008).

Lagoas ou tanques de sedimentação auxiliam na remoção de sólidos, os quais ficam no fundo e devem ser removidos periodicamente, necessitando de uma filtração final para retirar partículas finas em suspensão, e um tratamento químico ou biológico posterior que visa reduzir a quantidade de elementos não desejados, bem como levar para os limites aceitáveis os níveis de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a presença de micro-organismos, para que se despeje o efluente no sistema de tratamento público, ou mesmo possibilitar o reaproveitamento da água pela própria planta. Possíveis tratamentos químicos incluem a adição de cal, formalina, persulfato de amônia ou ácido fórmico, entre outros. Ao final, uma cloração desta água pode ser realizada para eliminar os micro-organismos patogênicos (NASCIMENTO et al., 2000; DORS et al., 2006).

Os métodos químicos são utilizados para remover material coloidal, cor e turbidez, odor, ácidos, álcalis, metais pesados e óleos. Os processos físico-químicos permitem uma remoção parcial dos sólidos totais, empregando compostos como sulfato de alumínio, cloreto férreo e sulfito ferroso (MENDES et al., 2005).

3.5.3. Métodos Biológicos de Tratamento

Os processos biológicos dividem-se em aeróbios e anaeróbios (MENDES et al., 2005).

Os sistemas biológicos de tratamento de resíduos devem atender a alguns aspectos importantes como a remoção da matéria orgânica traduzida na redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), e a possível degradação de compostos químicos orgânicos de difícil degradação, para o fornecimento de um efluente em condições que não afete o equilíbrio do sistema receptor final, como rios e lagos (MENDES et al., 2005).

Os Processos biológicos convencionais, como aeróbios e anaeróbios, requerem uma relação DBO/DQO (razão de biodegradabilidade) de valor mínimo igual a 0,4 (DURLI, 2007).

O tratamento dos despejos de uma indústria alimentícia é, em sua maior parte, do tipo biológico. O tratamento biológico, portanto, age na remoção da matéria orgânica facilmente biodegradável, pelo processo do metabolismo de oxidação e síntese de células (DORS et al., 2006).

Os métodos biológicos de tratamento se dividem em processos aeróbios e anaeróbios:

3.5.3.1. Processo aeróbio

Este é um processo fundamentado no fornecimento de oxigênio, fazendo com que os micro-organismos biodegradem a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, transformando-a em gás carbônico, água e flocos biológicos (GIORDANO, 2004; DURLI, 2007).

3.5.3.2. Processo anaeróbio

O processo anaeróbio é efetuado por bactérias que não necessitam de oxigênio para a sua respiração. Na lagoa anaeróbia, a matéria orgânica é decomposta gradativamente em estruturas moleculares menores, cujos produtos finais da degradação fermentativa são o metano e o gás carbônico (DURLI, 2007).

3.6. Legislação brasileira para o lançamento de efluentes contendo alto teor de lipídios

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece limites de concentrações para constituintes químicos presentes nos efluentes, bem como outros parâmetros. A qualidade desses efluentes deve estar vinculada à qualidade do corpo receptor. A preservação da qualidade dos cursos de água exige que os efluentes sejam adequadamente tratados, antes de serem despejados em corpos de água (<http://ecocell.com.br/PDF/Artigo01.pdf>).

Com a chegada de novas indústrias multinacionais ao país e com a ampliação das que já se encontravam estabelecidas, tem sido constantemente questionado se farão os mesmos investimentos em proteção ambiental que normalmente fazem em seu país de origem. Diante destes fatos, os órgãos ambientais têm procurado adequar-se às novas exigências e têm fiscalizado mais efetivamente estas empresas criando, dessa forma, um campo de trabalho promissor para consultorias especializadas (<http://ecocell.com.br/PDF/Artigo01.pdf>).

Efluentes têm diferentes origens e, portanto, devem ser consideradas diferentes abordagens em seus tratamentos, de acordo com a natureza e padrões que precisam ser atingidos. Podem ser considerados como os domésticos, industriais, agrícolas e águas pluviais (provenientes do sítio industrial, ou não). Portanto, a referida resolução dispõe sobre a classificação dos corpos de água e as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, como também estabelece as condições e os padrões de seus lançamentos, dando, contudo, outras providências (RESOLUÇÃO CONAMA nº 357 de 2005).

Entretanto, o tratamento de efluentes pode ser dividido em três etapas:

1)Tratamento primário – é empregado para a remoção de sólidos em suspensão e material graxo (óleos e graxas), como também para equalização (amortecimento de picos de concentração e/ou vazão). Também pode ser considerado o ajuste de pH.

Equalização – é realizada em um tanque de volume e configuração definidos adequadamente, com vazão de saída constante e com precauções para a minimização da sedimentação de eventuais sólidos em suspensão, por meio de dispositivos de mistura,

permitindo absorver variações significativas de vazão e de cargas poluentes dos efluentes líquidos que necessitam ser tratados, atenuando picos de carga para a estação de tratamento e facilitando e permitindo otimizar a operação da estação como um todo, contribuindo para que os parâmetros finais desejados possam ser atingidos (TOCCHETTO, 2008).

2)Tratamento secundário – é empregado para a remoção do material orgânico solúvel de natureza biodegradável, sob ação biológica.

3)Tratamento terciário – visa à remoção do material solúvel não removido nas etapas de tratamento anteriores, como é o caso dos nutrientes (N e P), de metais pesados, compostos orgânicos recalcitrantes e/ou refratários ou ainda de substâncias que conferem cor e odor. Pode ainda visar desinfecção do efluente, gerando água candidata para o reuso (DEZOTTI, 2008).

Na resolução CONAMA nº 357 de 2005, artigo 34, é citado que os efluentes com elevado teor de lipídios, de qualquer fonte poluidora, somente poderão ser lançados nos corpos de água, direta ou indiretamente, se obedecerem às seguintes condições:

- a) Potencial hidrogeniônico (pH) entre 5 e 9;
- b) Temperatura: inferior a 40°C, sendo que a elevação de temperatura do corpo hídrico receptor não deverá exceder a 3°C na zona de mistura;
- c) Materiais sedimentáveis: até m/litro em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;
- d) Regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vez, referente a vazão média do período da atividade diária do agente poluidor;
- e) Óleos e graxas:
 - ✓ Óleos minerais até 20 mg/L;
 - ✓ Óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L (ALBERTON, 2009).
- f) Deverão estar virtualmente ausentes:
 - ✓ Materiais sólidos flutuantes, inclusive, espumas não naturais;
 - ✓ Corantes provenientes de fontes antrópicas;
 - ✓ Resíduos sólidos objetáveis.

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

- g) Tratamento especial, se provirem de estabelecimentos hospitalares e outros onde haja despejos infectados com micro-organismos patogênicos (GIORDANO, 2004).
- h) Para uma vazão de 7.000 m³/dia de efluente, a matéria orgânica biodegradável representada pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) deverá ser inferior a 70 mg/L ou 490 Kg DBO/dia e a matéria orgânica total (biodegradável ou não) representada pela Demanda Química de Oxigênio (DQO) deverá ser inferior a 175 mg/L ou 1225 Kg DQO/dia (ALBERTON, 2009).

Para efeito de toxicidade, deverão ser realizados ensaios ecotoxicológicos padronizados ou por outro método cientificamente reconhecido, por instituições nacionais ou internacionais renomadas (RESOLUÇÃO CONAMA nº 357 de 2005).

3.7. Produção de lipase por *Cunninghamella* (Matr. 1903)

Micro-organismos são fontes de óleos comestíveis, porque possuem habilidade de produzir óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, diferenciando-se de óleos vegetais, os quais são de grande importância para a nutrição infantil, sendo também utilizados como suplementos dietéticos (RATLEDGE, 2002; VICENTE et al., 2009).

Shaw (1965) analisou ácidos graxos de 31 espécies de fungos, pertencentes às classes Oomicetos, Zigomicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos e detectou a presença de ácido graxo γ -linolênico 18:3 (6, 9, 12), pertencentes a família ω 6, nos representantes dos Oomicetos e zigomicetos, sendo apresentada maior quantidade deste ácido graxo na ordem Mucorales. Praticamente todas as espécies desta ordem sintetizam este ácido graxo, além do ácido linoléico 18:2 (9, 12) (SILVA, 1996).

O acúmulo de lipídios nos micro-organismos oleaginosos inicia quando há exaustão de nutrientes no meio de cultura, principalmente do nitrogênio, todavia contendo uma quantidade de carbono (glicose) que continua sendo assimilada pela célula, convertendo-se em triglicerídio, onde os lipídios são sintetizados durante o balanceamento da fase de crescimento do micro-organismo. Logo, na limitação do nitrogênio há produção de lipídios os quais são estocados dentro das células existentes (RATLEDGE, 2002).

De acordo com Silva (1996) foi afirmado por Ratledge (1982) que representantes do gênero *Cunninghamella*, juntamente com outros fungos da ordem Mucorales, são considerados oleaginosos.

Considerando a habilidade do gênero *Cunninghamella* em metabolizar compostos xenobióticos pela secreção de hidrolases é revelado, pela literatura, um crescente aumento de estudos com esse fungo, pela sua potencialidade nos processos de biodegradação, biorremediação e biotransformação (LIMA, 2003; VASCONCELOS et al., 2003).

A biotransformação da zidovudina também foi realizada pela utilização de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 como catalisador. Este Zigmocete é amplamente conhecido por realizar reações de biotransformação em uma variedade de compostos, de forma semelhante aos mamíferos, sendo bastante empregada nos processos de bioconversão (NUNES, 2008; FREITAS, 2009).

Cunninghamella elegans pode metabolizar uma ampla variedade de compostos xenobióticos devido a régio e estereosseletividade, de modo semelhante ao sistema enzimático dos mamíferos (MOODY et al., 1999).

Também, têm sido descritas habilidades de *C. elegans* em oxidar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e compostos de petróleo, assim como a capacidade de várias espécies da ordem Mucorales como *Mucor*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum* em atuarem na bioassorção de Cobre, Cádmio e Zinco sob as formas de micélio vivo e micélio morto, utilizando a biomassa como elemento de sorção. Souza (2004) estudou o cultivo de *C. elegans* em meio contendo cobre, com o objetivo de estabelecer os aspectos fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais. Os resultados obtidos por meio dos aspectos ultraestruturais apresentaram eletrodensidade, mostrando hifas mais largas de textura mais homogênea, um menor número de clamidiosporos e poder de ramificação, demonstrando o seu potencial na aplicação de biorremediação em ambientes poluídos com cobre e metais pesados (SOUZA, 2004).

O gênero *Cunninghamella* é frequentemente encontrado no solo, em grãos e em outros substratos orgânicos. É de grande importância para as áreas médica, industrial e ambiental, devido à capacidade de responder a inúmeras alterações ambientais, tais como concentrações de gases e mudanças físico-químicas (LIMA et al., 2003).

À semelhança da maioria dos fungos, as espécies de *Cunninghamella* são muito sensíveis a pequenas variações do meio de cultura e o mesmo isolado, crescido em diferentes meios de cultura, pode apresentar aspectos macroscópicos diferentes. Isso também ocorre com relação a variações de temperatura e umidade (ALEXOPOULOS et al., 1996; VASCONCELOS et al., 2003).

3.8. Metabolismo dos Fungos

O metabolismo se constitui uma série de reações químicas que visa o armazenamento e o consumo de energia para as atividades biológicas que ocorrem nos seres vivos, incluindo os fungos. Serve para as funções anabólicas e catabólicas, ocorrendo na primeira a troca de nutrientes nos componentes estruturais e funcionais do organismo, sendo considerada a fase construtiva, e na segunda a extração de energia química ou de elementos nutritivos de substâncias complexas, para prover de energia e de materiais as reações anabólicas, a qual é considerada a fase de consumo. A função catabólica tem influência sobre essas reações (PUTZKE, 2004).

O metabolismo dos fungos, geralmente, é dividido em primário e secundário. O primeiro envolve reações metabólicas necessárias para sustentar o indivíduo, sendo considerado metabolismo dos carboidratos, dos compostos nitrogenados, do enxofre e dos lipídios. O segundo, portanto, envolve produção de numerosos compostos ou substâncias secundárias, que não são, aparentemente, essenciais à sustentabilidade do fungo (PUTZKE, 2004).

3.8.1. Metabolismo dos Lipídios

Na maior parte dos lipídios produzidos pelos fungos há a presença de triglicerídos e ácidos graxos, representados em 88%, havendo predominância dos ácidos graxos insaturados, como os oléicos e linoléicos. Praticamente, todos os fungos produzem esteróis em até 1%, sendo que para algumas espécies essa produção constitui parte do processo fermentativo final, onde o ergosterol é mais comum. De acordo com HUNTER & ROSE (1971) o peso seco das leveduras é constituído de 7% a 15% de lipídios, podendo ser encontrado em índices de até 60%, e, de acordo com BRENNAN & LÖSEL (1978) os fungos filamentosos apresentam índices entre 6% - 9% em fungos filamentosos (PUTZKE, 2004).

Fungos da família Cunninghamellaceae, ordem Mucorales, são de particular interesse, uma vez que podem constituir acima de 50% de lipídios em sua biomassa (SERGEEVA et al., 2008).

Não há necessidade de aclimatar os fungos a um meio de cultura para que esses produzam lipídios, entretanto, sua aclimatação pode melhorar o crescimento do micélio

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

como foi demonstrado por HUNTER & ROSE (1971) em *Pityrosporum ovale*. Entretanto, aclimatar fungos lipolíticos a um meio de cultura, limitante de nitrogênio, pode aumentar a produção de enzimas. Quanto mais limitante for o meio, maior a produção de enzimas pelos fungos. Não obstante, outros fatores podem influenciar na produção como seleção do fungo, pH, umidade, temperatura e quantidades diferentes de nutrientes (PUTZKE, 2004).

Os triglicerídos são hidrolisados por lipases, liberando glicerol e três ácidos graxos. O glicerol, após fosforilizado e oxidado, forma 3-fosfogliceraldeído e ácidos graxos, podendo entrar no processo glicolítico. Os ácidos graxos devem ser degradados para serem utilizados (PUTZKE, 2004).

3.9. Lipases

O médico francês Claude Bernard foi quem primeiro descobriu uma lipase no suco pancreático, em 1856, como enzima hidrolítica de óleos insolúveis convertendo-os em produtos solúveis. No sistema digestivo humano, ela tem como função transformar lipídios em ácidos graxos e glicerol. Algumas lipases são adicionadas durante o processo de fabricação do sabão em pó, com a finalidade de que manchas de gordura sejam retiradas de roupas e objetos. Também são utilizadas no tratamento de efluentes industriais com alta carga orgânica, como os de laticínios e aviários (HASAN et al., 2006; <http://pt.wikipedia.org/wiki/Lipase>).

São amplamente utilizadas na produção de alimentos, produção de detergentes, tratamento de efluentes, indústria farmacêutica, química bio-orgânica, biologia molecular e aplicações médicas (VASCONCELOS et al., 2003).

Portanto, a definição atual é bastante simples como: uma lipase é uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa (CASTRO et al., 2004).

De acordo com Mendes et al. (2005) as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas que estão presentes em acilgliceróis.

Estas estão envolvidas na quebra e mobilização dos lipídios dentro das células orgânicas, como também na transferência destes de um organismo para outro (HASAN et al., 2006).

Sua alta especificidade permite controlar os produtos, levando a um aumento de rendimentos por não gerar subprodutos tóxicos. Devido a essa especificidade, as condições de operação são moderadas, e faz com que haja redução na utilização de energia e equipamentos, o que torna o processo atrativo sob os pontos de vista econômico e ambiental (DORS et al., 2006).

As lipases são muito utilizadas em sínteses orgânicas devido a grande disponibilidade e baixo custo, pois não requerem co-fatores e atuam em uma ampla faixa de pH; são muito estáveis e apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, recentemente, nas aplicações industriais (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Lipases têm grande diferença quando relacionadas às suas origens e propriedades, podendo catalisar a hidrolise ou sintetizar uma grande variedade de ésteres carboxílicos, liberando ácidos orgânicos e glicerol (HASAN et al., 2006).

A habilidade das lipases na biocatálise hidrolítica, assim como na síntese de ésteres tem sido considerada há cerca de 70 anos (HASAN et al., 2006).

As lipases são encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (ROVEDA, 2007).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando de 20 a 75 kDa, atividade em pH nas faixas de 4 a 9, também variando com relação à temperatura, desde a ambiente até 70°C. Essas são comumente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, atividade ótima em uma faixa de temperatura entre 30 e 40°C (CASTRO et al., 2004).

Os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas colocarem no mercado lipases microbianas com elevada atividade, a um custo bem mais acessível. Dentre essas, as lipases fúngicas são as preferidas para a aplicação industrial (ROVEDA, 2007; ROVEDA et al., 2010).

A otimização das propriedades das lipases de relevante interesse industrial pode ser conseguida através da evolução direta. Além disso, aplicações biotecnológicas originais têm sido sucessivamente estabelecidas na síntese de biopolímeros e biodiesel, na produção de produtos farmacêuticos enantiopuros, produtos agroquímicos e compostos modificadores do sabor de alimentos (JAEGER e EGGERT, 2002; HASAN et al., 2006).

A identificação da atividade enzimática em micro-organismos e os estudos relacionados à otimização da produção de enzimas é de grande interesse para a indústria (VASCONCELOS et al., 2003).

O uso de fontes não convencionais de carbono e nitrogênio vem crescendo nos últimos anos. As águas de maceração de milho, hidrolisados protéicos, resíduos ricos em açúcares, proteínas ou material oleoso estão entre os que mais frequentemente são utilizados na produção de lipases (ROVEDA, 2007).

A utilização do efluente para a produção de lipases é um processo viável e de baixo custo, visto que este apresenta uma elevada carga de nutrientes que se encontram ainda disponíveis para o crescimento fúngico e a posterior produção de enzimas. A presença de lipídios no efluente possibilita a produção de lipases, uma vez que estes são utilizados como fonte de carbono para o crescimento dos fungos. As enzimas podem ser indutivas, ou seja, produzidas pelos micro-organismos na presença de um indutor, que pode ser o próprio substrato ou o produto da sua hidrólise, o qual pode ser adicionado ao meio de cultura para estimular a produção dessas (ROVEDA, 2007; ROVEDA et al., 2010).

A engenharia genética de lipases envolve a modificação do gene que codifica para a enzima. Esta tecnologia inclui a habilidade em isolar e expressar os genes de interesse, modificando aminoácidos que ocupem sítios importantes e realizem a atividade catalítica da enzima (DALLA-VECCCHIA et al., 2004).

O uso de enzimas em biocatálise ambiental vem ao encontro da forte tendência dos governos atuais que têm interesse em intensificar as restrições à poluição ambiental, o que além de ser de utilização simples e fácil no controle do processo, não tem necessidade de aclimatação de biomassa e efeitos de choque por carga de poluentes, operando em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade. No Brasil, o controle ambiental é de relevante necessidade para a preservação dos ecossistemas, pela sua extensão e biodiversidade, o que constitui em imensurável riqueza para o país, garantindo a representatividade nacional no cenário mundial (MENDES et al., 2005).

3.10. Subprodutos gerados pela biocatálise hidrolítica de ligações éster-carboxílicas e suas importâncias

3.10.1. Ácidos graxos

De modo geral, os lipídios são encontrados na forma de triacilgliceróis e pequena parte como ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). A constituição de triacilgliceróis é semelhante a de AGCL, contendo aproximadamente 80% de ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico, cuja maior presença é a de ácido oleico ($C_{18:1}$) (MENDES et al., 2005).

Zigomicetos, representantes do Reino Fungi, vêm demonstrando grande potencial em produzir essas macromoléculas, em especial, ácido palmítico, oléico e linolênico (ALEXOPOULOS et al., 1996; RUEGGER, 2001).

Micro-organismos têm sido investigados como fontes alternativas de produção do ácido gama-linolênico e algumas linhagens apresentadas como perspectiva de sua produção. Há relatos de que *Mortierella ramanniana*, *Mucor* sp., *Cunninghamella japonica* e *Entomophthora exitalis* produzam esse ácido. Atualmente, o Japão produz GLA em escala comercial, pela utilização do gênero *Mortierella* (RATLEDGE, 1993; CARVALHO et al., 1999).

O ácido γ -linolênico se constitue em um dos ácidos graxos essenciais, possuindo funções importantes, dentre as quais, a formação de prostaglandina E1, cujo uso é recomendado no tratamento da tensão pré-menstrual, osteoporose, processos inflamatórios e pressão sanguínea alta. Este ácido também é extraído de plantas como primula, porém torna-se mais viável extraí-lo de micro-organismos que apresentam uma boa produção, devido a não utilização de grandes áreas de plantio (RUEGGER, 2001).

O referido ácido já vem sendo produzido por meio de processos fermentativos, através desses fungos. No entanto, para a sua produção se faz necessário haver condições de cultura adequadas que propiciem o aumento da insaturação desses ácidos graxos (SILVA, 1996).

Lipases 1,3 específicas de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii* liberam ácidos graxos das posições 1 e 3, sintetizando produtos de diferentes composições, com relação aos obtidos pelas lipases não regiosseletivas, ou por um catalisador químico. O uso de lipase 1,3-específica tem excelente efeito condicionador

sobre a massa do pão, facilitando-lhe o manuseio em máquinas da indústria de panificação, melhorando a textura do miolo e aumentando o seu volume, bem como lhe conferindo uma cor mais branca. Neste processo, os lipídios presentes no trigo são degradados e a sua interação com o glúten é modificada, fazendo com que este obtenha uma rede mais forte e mais elástica (CASTRO et al., 2004).

A hidrólise seletiva da gordura do leite se constitue em outro exemplo de aplicação potencial de lipases. De acordo com Balcão e Malcata (1998) o declínio do consumo *per capita* da gordura do leite em diversos países e a demanda por leite e seus derivados com menor teor de gordura tem incentivado o interesse do setor industrial em encontrar alternativas adequadas para o seu uso. Desta forma, lipases específicas são responsáveis pela formação do aroma que distingue queijos do tipo Cheddar, substitutos de manteiga, produtos com aroma de queijo e outros aditivos, como os usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos, bolos e em outros alimentos. Os Hidrolisados deste tipo de gordura têm sido extensivamente utilizados em molhos, assados, pipocas e outros tipos de alimentos, apresentando resultados de produtos com melhor aroma e sabor, tornando-os mais aceitáveis no mercado. A adição de ácidos graxos confere uma variedade de efeitos organolépticos, dependendo da quantidade empregada. Há apenas um enriquecimento característico no aroma dos alimentos, quando o nível desses ácidos é baixo. À medida que se aumenta o teor, encontra-se um aroma semelhante ao da manteiga e, em níveis mais elevados, o aroma sugere o de queijo (CASTRO et al., 2004).

Os ácidos graxos saturados têm sido extensivamente utilizados na fabricação de combustíveis renováveis que não poluem o meio ambiente, os quais são considerados ecologicamente corretos, como é o caso do biodiesel (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/lipidios/axidos-graxos.php>).

A composição desses ácidos, com relação ao comprimento da cadeia e o grau de insaturação é determinada por análises cromatográficas que requerem modificações desses através da derivação química, convertendo-os em moléculas mais voláteis, ou em ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês Fatty Acid Methyl Esters), cuja abreviação é FAMEs (SILVA, 1996).

Os ácidos graxos podem ser apresentados como saturados ou insaturados, sendo formados por cadeias de átomos de carbono ligados a hidrogênio. Estes estão presentes em óleos e gorduras, podendo ser classificados de acordo com o tamanho (curta, média, longa)

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

ou com o tipo de ligação da cadeia hidrocarbonada (saturados, mono e poliinsaturados) (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/lipidios/axidos-graxos.php>).

3.10.1.1. Ácidos graxos saturados

Esses são normalmente encontrados na forma sólida em produtos de origem animal como leite integral, em especial, o da vaca e seus derivados (manteiga, creme de leite, chantilly, queijos gordurosos dos tipos provolone, parmesão, mussarela, reino e outros). Em banhas de porco e outros derivados como bacon, sebo, toucinho. Encontra-se, também, em gorduras de carnes, principalmente as de boi e em peles das aves e peixes. A gordura do coco se constitui em uma exceção pois, apesar de ser de origem vegetal, é rica em ácidos graxos saturados. Os alimentos que contêm esse tipo gordura, além da quantidade desejada, devem ser ingeridos em pequenas quantidades, sendo mais aconselhável a sua não ingestão, pois contribuem com o aumento dos níveis de colesterol no sangue (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/lipidios/axidos-graxos.php>).

3.10.1.2. Ácidos graxos insaturados

Esses ácidos graxos são normalmente encontrados na forma líquida, principalmente em óleos de origem vegetal, exceto em óleo de coco. Os óleos de peixes, apesar de serem produtos de origem animal, possuem alto índice desses ácidos, os quais contêm uma ou mais ligações duplas na cadeia. Quando os hidrogênios se encontram no mesmo lado do plano, são chamados de cis, se estão em lados opostos, de trans. Os ácidos graxos trans estão presentes em produtos industrializados, como na maioria das margarinas hidrogenadas que contêm gorduras de origem vegetal. Em grandes quantidades, os ácidos graxos trans são tão ou mais prejudiciais que os ácidos graxos saturados, no que diz respeito à elevação dos níveis de colesterol no sangue (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/lipidios/axidos-graxos.php>).

Quando o ácido graxo possui uma única dupla ligação é conhecido como monoinsaturado, se contiver duas ou mais ligações duplas é denominado poliinsaturado. Os monoinsaturados estão presentes, em maior quantidade, no azeite de oliva e nos óleos de canola e amendoim. Já os poliinsaturados estão presentes em óleos vegetais, tais como os de girassol, milho, soja, algodão, oleaginosas como castanhas, amêndoas e outras, bem

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

como em óleos de origem animal como os de peixes (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/lipidios/axidos-graxos.php>).

O consumo moderado de alimentos contendo fontes de ácidos graxos insaturados contribui com a diminuição dos níveis de colesterol circulantes no sangue e, consequentemente, com um menor risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/lipidios/axidos-graxos.php>).

Os ácidos graxos poliinsaturados são considerados essenciais para o organismo, pois não são sintetizados pelas células do nosso corpo, portanto devem ser obtidos através da ingestão de alimentos que os contenha. Existem, portanto, dois ácidos graxos essenciais como o ômega-3 ou ácido linolênico, que é encontrado principalmente em óleo de peixes, e o ômega-6 ou ácido linoléico, cujas melhores fontes são os óleos vegetais de girassol, milho, soja e algodão (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/lipidios/axidos-graxos.php>).

Os ácidos graxos dos tipos ômega 3 são considerados carboxílicos poliinsaturados, em que a dupla ligação está no terceiro carbono, a partir da extremidade oposta à carboxila e, quando ingeridos, auxilia na diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesterol ruim (LDL) no sangue, enquanto pode favorecer o aumento do colesterol bom (HDL). Possui, ainda, importante papel em alergias e em processos inflamatórios, pois são necessários para a formação das prostaglandinas inflamatórias, tromboxanos e leucotrienos, os quais podem ser encontrados em nozes, castanhas, peixes, especialmente em peixes de águas frias, assim como em rúculas e óleos vegetais de canola, soja e milho e azeite de oliva (http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%94mega_3).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do resíduo do efluente da indústria de sorvetes

A coleta do resíduo do efluente de sorvete foi realizada em uma indústria de sorvetes, considerada de grande porte, situada no pólo industrial de Paratibe – Paulista, PE, Brasil.

Em 2002 a indústria possuía capacidade para produzir sorvetes um pouco acima do volume de 2000L/dia. Atualmente, a referida indústria tem capacidade para produzir 9,5 mil litros de sorvetes/hora, sendo a mais forte concorrente das multinacionais Unilever e Nestlé. Ocupando nas vendas em supermercados o quarto lugar no país e o segundo lugar no nordeste, abastecendo mais de 7 mil pontos de vendas de conveniência e uma rede de 550 lojas, concentrando 55% do faturamento do estado. Uma das estratégias adotadas pela indústria para concorrer com os produtos das multinacionais é produzir considerando o clima da região, utilizando frutas regionais na matéria-prima, uma vez que as multinacionais trabalham com fórmulas globais (Empresas mercados, empresários e executivos, 2011).

O resíduo sólido do efluente da referida indústria de sorvetes foi coletado no primeiro tanque de decantação da Estação de Tratamento de Efluentes – ETE (Figura 1), em agosto/2010, por funcionários da própria empresa com auxílio de pás coletoras. O mesmo foi acondicionado em sacos plásticos sendo, logo em seguida, transportado ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os sacos plásticos foram guardados em uma caixa organizadora com tampa, a fim de economizar espaço dentro da câmara fria, onde foram mantidos a 4°C.



FIGURA 1. Estação de Tratamento de Efluente da indústria de sorvetes. A. Tanque de recepção do efluente; B. Vista parcial dos 8 tanques de decantação; C. Transferência do resíduo para tanques de secagem; D. Tanque de secagem (seta amarela) do resíduo sólido e os biorreatores do tipo UASB (seta branca).

4.2. Caracterização físico-química do resíduo do efluente de sorvete

Todas as análises físico-químicas, incluindo a caracterização do efluente sólido da indústria de sorvetes, foram realizadas pelo Instituto de Tecnologia de Pernambuco – ITEP, Recife - PE.

O resíduo sólido do efluente de sorvete foi referenciado pelo ITEP como lodo do sorvete, devido o seu aspecto, onde foram analisados os parâmetros potencial hidrogeniônico (pH), demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e carbono orgânico total (COT), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), óleos e graxas total, potássio total (K) e fósforo total (P). Os métodos utilizados para as análises foram APHA – Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st edition, 2005; EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Manual e Métodos de Análises de Solo, 2^a edição, 1997 e método de determinação de NKT, desenvolvido por Johan Kjeldahl (1883).

4.3. Procedência e manutenção dos micro-organismos

As linhagens utilizadas no processo de seleção para adaptação ao meio de cultura contendo o efluente sólido de sorvete foram procedentes da Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

A manutenção das culturas (Tabela 3) foi realizada em placas de Petri, contendo o meio Ágar Dextrose Batata (BDA - Batata inglesa 150g; Glicose 10g; Agar bacteriológico 15g e Água destilada *qsp* 1000 ml), sob refrigeração (4° C).

Tabela 3. Lista dos Zygomycetes cedidos pela micoteca URM – Universidade Federal de Pernambuco

Nº	Registro URM	Zygomycetes
01	5719	<i>Cunninghamella blakesleeana</i> (Lendner)
02	2136	<i>C. echinulata</i> (Mat.) Thaxter
03	5017	<i>C. echinulata</i> (Mat.) Thaxter
04	3172	<i>C. elegans</i> (Lendner)
05	3173	<i>C. elegans</i> (Lendner)
06	3491	<i>C. elegans</i> (Lendner)
07	4017	<i>C. elegans</i> (Lendner)
08	4177	<i>C. elegans</i> (Lendner)
09	4473	<i>C. elegans</i> (Lendner)
10	*5780	<i>C. elegans</i> (Lendner)
11	*6017	<i>C. elegans</i> (Lendner 1905)
12	1941	<i>Mortierella aliaceae</i> (Linnemann)
13	3534	<i>M. isabellina</i> (Oudem)
14	4148	<i>Mucor circinelloides</i> (Lendner) Schipper
15	4182	<i>M. circinelloides</i> (Schipper)
16	4183	<i>M. circinelloides</i> (Schipper)
17	4184	<i>M. circinelloides</i> (Schipper)
18	4192	<i>M. circinelloides</i> (Schipper)
19	4425	<i>M. circinelloides</i> (Samutsevitsch)

*Linhagens selecionadas

4.3.1. Condições de crescimento de zygomycetes em concentrações de resíduo do efluente de sorvete para o seu posterior tratamento

Os micro-organismos descritos na tabela 3 foram avaliados quanto o crescimento em meio ágar resíduo sólido nas concentrações 5, 10 e 15% (m/v), a fim de serem selecionados para posterior tratamento do resíduo (Figura 2). Os blocos de gelose das linhagens foram obtidos pelo crescimento das mesmas em todo o diâmetro das placas de Petri contendo extrato de malte – MEA e BDA.

Foram preparados frascos de Erlenmeyer (capacidade para 500 mL) contendo 180 mL de água destilada adicionado de 9g de ágar bacteriológico, esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Depois do resfriamento ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) dos frascos foram adicionadas concentrações do resíduo sólido do efluente bruto. Os frascos foram agitados manualmente por, aproximadamente, 15 min. O meio de cultura foi vertido em placas de Petri e, em seguida, transferido 1 (um) bloco de gelose ($\varnothing 6$ mm) por placa de Petri (centro). As placas foram envolvidas em papel filme e transferidas para estufa, sendo mantidas a 30°C .

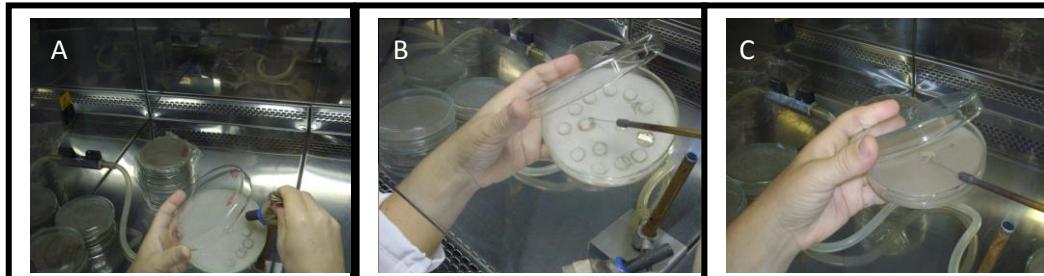


FIGURA 2. Transferência do micro-organismo para placa de Petri contendo o meio ágar resíduo sólido (5, 10 e 15% m/v) da indústria de sorvetes. A. Perfurando com “furador de rolha”; B. Transferência para placa de Petri; C. Colocação no ponto central da placa de Petri.

4.3.2. Crescimento em larga escala

As linhagens que cresceram foram transferidas para frascos de Ferhembach (capacidade para 2800 mL) contendo 500 mL de água destilada esterilizada adicionado 15% (m/v) do resíduo sólido do efluente bruto de sorvete. Nestes ensaios foram transferidos 8 blocos de gelose de ($\varnothing 6$ mm) das linhagens *C. elegans* URM6017 e *C. elegans* URM5780 para cada frasco. Os testes foram realizados em triplicata com um

controle abiótico de cada linhagem, contendo apenas água destilada adicionada do resíduo sólido do efluente de sorvete.

4.4. Produção de lipase

4.4.1. Condições de crescimento

Através da utilização da técnica de fermentação submersa, foram preparados 12 frascos de Ferhembach (capacidade para 2800 mL), 6 com uma das linhagens selecionadas *C. elegans* URM6017 e 6 controles abióticos (conforme item 4.3.3.), a fim de se obter o extrato enzimático no volume de 2L para cada amostra. Os frascos foram transferidos para estufa, mantidos a 30°C, durante 17 dias. Ao final de 17 dias foram aferidos os parâmetros de Demanda Bioquímica de Oxigênio, Demanda Química de Oxigênio e pH pelo ITEP.

Para a produção de lipase foi utilizado o método descrito por Roveda (2007), utilizando-se como meio de cultura 0,1% de nitrato de sódio (NaNO_3), 0,1% de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 0,05% de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 1% de azeite de oliva (extra-virgem) como indutor. Sendo realizado um tratamento com o azeite de oliva adicionado de 15% (m/v) do resíduo sólido do efluente de sorvete.

Os dois procedimentos foram realizados em triplicata com dois controles abióticos, conforme item 4.3.3, para cada tipo de amostra.

4.4.2. Determinação da atividade lipásica

Para a atividade de lipase foi seguido o método descrito por Watanabe et al. (1977) no qual foi utilizado óleo de oliva (10% m/v) como substrato para dosagem da enzima, os quais foram emulsionados por três minutos com goma arábica (5% p/v) em água destilada. A cada 5 mL da emulsão foi adicionado 1 mL do extrato enzimático bruto, incubado por 1 hora a 37°C, sendo posteriormente titulados com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,025 M).

A dosagem da atividade foi realizada com a adição de 2 gotas de fenolftaleína como indicador, em cada frasco de penicilina, assim como no branco (sem o extrato enzimático). A média aritmética dos valores foi utilizada para determinação do cálculo da atividade enzimática. Uma unidade de atividade lipásica foi definida como a quantidade de enzima

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições do ensaio e determinada através da equação descrita abaixo, segundo Leal (2000). Para o fator de correção utilizou-se ácido clorídrico (HCl - 0,025 M) utilizando-se a mesma dosagem de fenolftaleína como indicador, titulando-se com uma solução de NaOH (0,025 M). A titulação foi realizada com o auxílio de uma bureta automática marca Aptilab (Figura 3). O procedimento ocorreu em triplicata, exceto para os brancos utilizados como padrão.



FIGURA 3. Amostra da titulação com NaOH e HCl a 0,025 M, com o auxílio de uma bureta automática marca Aptilab.

Para determinação da atividade enzimática foi utilizada a equação 1.

$$AL = (V1 \cdot M \cdot fc / V2 \cdot t) \cdot 1000 \quad (1)$$

Onde, AL = Atividade lipásica (U/mL), sendo U=1 μmol de ácidos graxos liberados em 60 min.

$$V1 = \text{Volume da amostra titulada} \quad \left| \begin{array}{l} fc = \text{fator de correção} \\ V2 = \text{Extrato enzimático} \end{array} \right. \quad \left| \begin{array}{l} M = \text{Molaridade da solução NaOH} \\ t = \text{tempo} \end{array} \right.$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do resíduo do efluente da indústria de sorvetes

Os resultados da caracterização do resíduo sólido do efluente da indústria de sorvetes, obtidos pelo ITEP, encontram-se na tabela 4.

Tabela 4. Resultados da caracterização do resíduo do efluente de sorvete

Parâmetros	Resultados	Unidade	Método
pH	4,45	-	SMEWW 4500 -H +B
Demandra Química de Oxigênio (DQO)	363.872,6	mg O ₂ /L	SMEWW 5220 C
Demandra Bioquímica de Oxigênio (DBO)	191.555,5	mg O ₂ /L	SMEWW 5210 B
Carbono Orgânico Total (COT)	28,0	g/Kg	EMBRAPA
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	126,4	g/Kg	SMEWW 4500 N
Óleos e Graxas Total	658,45	mg/Kg	SMEWW 5520 D
Potássio Total (K)	340,0	mg/Kg	SMEWW 3120 B
Fósforo Total (P)	1.580,0	mg/Kg	SMEWW 3120 B

Os resultados da caracterização do efluente da indústria de laticínios apresentados por Roveda (2007) (item 5.3) foram inferiores aos resultados da caracterização do efluente sólido da indústria de sorvetes, pelo fato de se tratar de um efluente líquido, apesar de conter grande concentração de óleos e graxas, devido ter sido coletado na saída do equalizador.

Segundo Azbar & Yonar (2004) efluentes gerados nas indústrias de refino de óleo e os produzidos pelas indústrias de laticínios, geralmente, apresentam razão de biodegradabilidade DBO/DQO de 0,2, indicando a necessidade de um pré-tratamento antes da etapa biológica (DURLI, 2007).

De acordo com Alberton (2009) a baixa biodegradabilidade do efluente é estimada com razões abaixo de 0,6.

Com relação a biodegradabilidade, o resíduo sólido do efluente da indústria de sorvetes apresentou razão DBO/DQO igual a 0,5264, mostrando a necessidade de um pré-tratamento, antes do seu descarte em corpo d'água.

O resíduo sólido do efluente de sorvete apresentou razão de biodegradabilidade DQO/DBO igual a 1,8995 que, de acordo com a CETESB (2001) pode ser utilizada para distinguir as concentrações de oxigênio dissolvido na água.

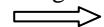
Tendo em vista que o pH obtido na caracterização foi 4,45, a legislação estabelece uma faixa de pH entre 5 e 9 para o lançamento direto nos corpos receptores (conforme artigo 18, Decreto 8468/76) e entre 6 e 10 para o lançamento na rede pública seguida de estação de tratamento de esgotos (CETESB, 2001).

5.2. Seleção de crescimento das linhagens de Zygomycetes em meio contendo resíduo do efluente de sorvete

Das 19 linhagens de Zygomycetes testadas (Tabela 5) foram selecionadas as linhagens de *Cunninghamella elegans* URM5780 e URM6017 (Figura 4) por apresentarem crescimento do diâmetro da colônia em toda extensão da placa de Petri em 3 dias.

Tabela 5. Crescimento do diâmetro da colônia das linhagens de Zygomycetes em MEA e em meio sólido contendo diferentes concentrações do resíduo do efluente da indústria de sorvetes (5, 10 e 15% m/v)

Registro URM	Zygomycetes	Crescimento em MEA	Crescimento a 5% do RS	Crescimento a 10% do RS	Crescimento a 15% do RS
5719	<i>Cunninghamella blakesleeana</i>	2 dias	4 dias	ñ cresceu	4 dias
2136	<i>C. echinulata</i>	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu
5017	<i>C. echinulata</i>	3 dias	4 dias	ñ cresceu	4 dias
3172	<i>C. elegans</i>	3 dias	4 dias	4 dias	5 dias
3173	<i>C. elegans</i>	3 dias	4 dias	4 dias	4 dias
3491	<i>C. elegans</i>	3 dias	4 dias	5 dias	5 dias
4017	<i>C. elegans</i>	4 dias	5 dias	4 dias	8 dias
4177	<i>C. elegans</i>	3 dias	4 dias	4 dias	5 dias
4473	<i>C. elegans</i>	2 dias	3 dias	ñ cresceu	3 dias
5780*	<i>C. elegans</i>	2 dias	3 dias	4 dias	3 dias
6017*	<i>C. elegans</i>	2 dias	3 dias	4 dias	3 dias
1941	<i>Mortierella. aliaceae</i>	5 dias	ñ cresceu	3 dias	4 dias
3534	<i>M. isabellina</i>	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu
4148	<i>Mucor circinelloides</i>	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu
4182	<i>M. circinelloides</i>	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu
4183	<i>M. circinelloides</i>	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu



4184	<i>M. circinelloides</i>	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu
4192	<i>M. circinelloides</i>	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu	ñ cresceu
4425	<i>M. circinelloides</i>	4 dias	ñ cresceu	ñ cresceu	5 dias

Obs.: Valor proporcional do resíduo sólido (RS) do efluente de sorvetes em gramas: **5% = 12,5g; 10% = 25g; 15% = 37,5g.** *Crescimento em toda a placa de Petri (Ø60mm)

Continuação página anterior

Outros Zygomycetes são relatados como oleaginosos, entretanto *Cunninghamella echinulata* URM2136 e a maioria dos isolados de *Mucor circinelloides* não cresceram no efluente sólido de sorvete (SILVA, 1996; VICENTE et al., 2009).

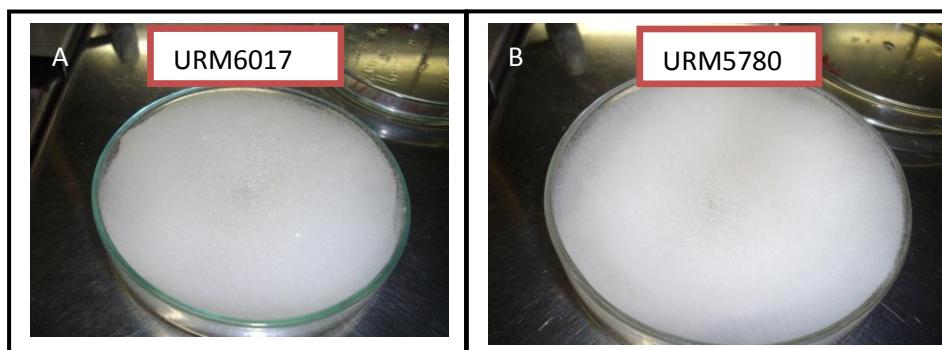


FIGURA 4. *Cunninghamella elegans* URM6017 (A) e *C. elegans* URM5780 (B) com 3 dias de crescimento em meio contendo 15% (m/v).

5.3. Características microscópicas das linhagens selecionadas

Após o crescimento das linhagens selecionadas *C. elegans* URM6017 e *C. elegans* URM5780 foram confeccionadas lâminas (Figura 5), as quais foram coradas com azul de Amman para confirmação das espécies.

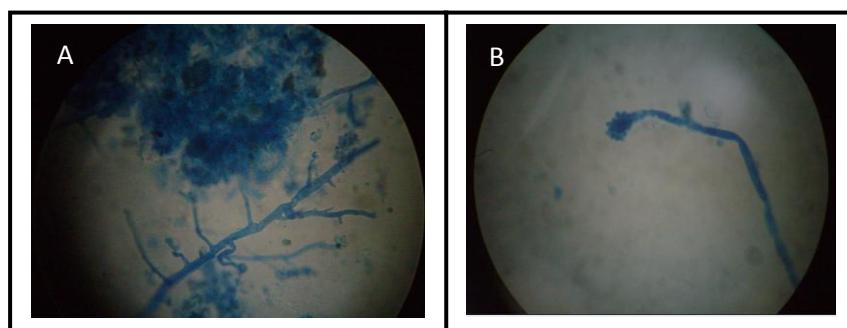


FIGURA 5. Características microscópicas das linhagens selecionadas. A. Micélio contendo esporangióforos, esporângios e milhares de esporangiósporos liberados por *C. elegans* 6017; B. Esporangióforo contendo um esporângio liberando esporangiósporos por *C. elegans* 5780.

5.4. Determinação das análises físico-químicas do efluente tratado pela linhagem *Cunninghamella elegans* URM6017

A linhagem *C. elegans* URM6017 apresentou bom desenvolvimento, após 17 dias de cultivo, mostrando completa adaptação ao meio contendo concentração de 15% do resíduo sólido de sorvete (Figura 6).



FIGURA 6. Desenvolvimento da linhagem *C. elegans* URM6017 em frascos de Ferhembach, após 17 dias de tratamento.

Os resultados da análise físico-química encontram-se descritos na tabela 6.

Tabela 6. Análises físico-químicas do resíduo do efluente tratado pela linhagem *C. elegans* URM6017

Parâmetros	Resultados e índices de redução dos principais parâmetros com relação à caracterização					Unidade	Método
	T ₀	Controle Abiótico	%	T ₁	%		
pH	4,45	5,12	15,05	6,87	54,38	-	SMEWW 4500-H +B
Demandânia Química de Oxigênio (DQO)	363.872,6	33.037,9	63,43	16.202,4	95,54	mg O ₂ /L	SMEWW 5220 C
Demandânia Bioquímica de Oxigênio (DBO)	191.555,5	21.930,5	88,55	12.083,3	93,69	mg O ₂ /L	SMEWW 5210 B
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	126,4	100,07	20,83	42,88	66,07	g/Kg	SMEWW 4500 N
Óleos e Graxas Total	658,45	15638,0	-	1.220,0	-	mg/Kg	SMEWW 5520 D
Potássio Total (K)	340,0	6,7	98,02	< 0,5	99,85	mg/Kg	SMEWW 3120 B
Fósforo Total (P)	1.580,0	12.631,0	-	5.580,0	-	mg/Kg	SMEWW 3120 B

T₀ = Tempo zero (resultado da caracterização do efluente)

T₁ = Tempo pós- tratamento (após o 17º dia de crescimento da linhagem *C. elegans* URM6017)

Controle abiótico – mencionado no item 4.3.3.

Durante todo o ensaio não houve ajuste do pH, sendo este avaliado após o 17º dia de tratamento pela linhagem *C. elegans* URM6017, cujo resultado ficou próximo da neutralidade, encontrando-se dentro dos limites estabelecidos para o seu descarte em corpo d'água.

De acordo com os resultados obtidos houve redução da DBO em 93,69% e DQO em 95,54%, bem como NTK em 66,07% e K em 99,85%. Os resultados foram comparados com os valores obtidos na caracterização do resíduo. *Cunninghamella elegans* URM6017 mostrou-se bastante adaptada ao efluente, não havendo necessidade de adicionar outro componente ao meio de cultura.

Nirenberg & Ferreira (2005) relatam que o efluente líquido da indústria de laticínios teve uma eficiência de 99,5% da DBO na Estação de Tratamento da Nestlé- Goiana.

Dors (2006) relata que a DQO do lodo e do efluente bruto da indústria de produtos avícolas no início dos ensaios de biodegradabilidade eram 896,69 mg O₂.L⁻¹ e 581,81 mg O₂.L⁻¹, respectivamente. Ao final dos testes o valor da DQO para o lodo e para o efluente bruto foi 555,57 mg O₂.L⁻¹ e 398,13 mg O₂.L⁻¹, respectivamente. Em termos de remoção de matéria orgânica atingiram-se valores de 38,04% para o lodo e 31,57% para o efluente bruto.

Todos os valores apresentados por Dors (2006) foram inferiores aos encontrados no ensaio com o efluente sólido da indústria de sorvetes (Tabela 6).

Roveda (2007), através da caracterização dos efluentes da indústria de laticínios, encontrou na saída do equalizador valores para DBO de 452,0 mg/L, DQO de 803,27 a 4975,95 mg/L, NTK variando de 0,50 a 12,32 mg/L, fósforo total variando de 0,16 a 0,55 mg/L e óleos e graxas variando de 0,01 a 4,40 mg/L. Já na saída do aerador os valores encontrados foram: DBO de 255,3 mg/L, DQO de 76,58 a 2810,22 mg/L, NTK de 1,01 a 35,62 mg/L, fósforo total variando de 0,06 a 0,32 mg/L e óleos e graxas variando de 0 a 5,31 mg/L. Ao final do processo de tratamento, obteve 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 foram: DQO 835,97±17,26 mg/L; fósforo 0,26±0,04 mg/L; NTK 10,55±0,15 mg/L e óleos de graxas 4,032±0,344 mg/L e para o efluente da saída do aerador foram: DQO 115,90±61,37 mg/L; fósforo de 0,06±0,01 mg/L; NTK 14,45±0,05 mg/L e óleos e graxas 4,084±0,051 mg/L.

Os valores da redução da matéria orgânica contida no efluente sólido da indústria de sorvetes (Tabela 6), após 17 dias de tratamento com lipase, foram superiores aos valores obtidos por Roveda (2007).

Alberton (2009) em seus experimentos para a hidrólise do efluente de laticínios, por fungos isolados do próprio efluente, obteve 30% da remoção de óleos e graxas utilizando o efluente esterilizado e 20% utilizando o efluente não esterilizado, através da técnica de fermentação submersa, após 12 h de incubação. Obteve 38% de remoção de óleos e graxas utilizando o efluente não esterilizado a 35°C, em 72 h. Quando utilizou o efluente esterilizado as remoções foram realizadas por *Rhizopus microsporus* e quando utilizou o efluente não esterilizado as remoções foram realizadas por micro-organismos endógenos do efluente. Quanto as razões de biodegradabilidade DBO₅/DQO utilizando o efluente esterilizado foi 0,59 e utilizando o efluente não esterilizado foi 0,30, incubados por 12 h em fermentação submersa. Na fermentação em estado sólido a razão de biodegradabilidade DBO₅/DQO obtida para o efluente esterilizado foi 0,64 e para o efluente não esterilizado foi 0,45, em 12 h de fermentação. Após 72 h as razões DBO₅/DQO obtiveram uma redução de 0,44 e 0,12 para os efluentes esterilizado e não esterilizado, respectivamente. Essa redução mostrou que o longo período de incubação em técnica da FES favoreceu a remoção da matéria orgânica por *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM e microrganismos endógenos, indicando a aplicação de técnicas alternativas no tratamento de efluentes contendo alta concentração de lipídios.

A razão de biodegradabilidade DBO₅/DQO obtida por Alberton (2009) utilizando o efluente esterilizado pela técnica de fermentação submersa foi de 0,59, podendo se comparar ao valor obtido com o efluente sólido de sorvete, também utilizando a técnica de fermentação submersa, cujo valor apresentado foi de 0,52.

A tabela 7 mostra a eficiência de redução da DBO em 44,90% e DQO em 50,95% com relação ao controle abiótico. O pH do controle abiótico ficou fracamente ácido (= 5,12).

Tabela 7. Avaliação da eficiência do efluente tratado pela linhagem *C. elegans* URM6017 com relação ao controle abiótico

Parâmetros	Resultados e índices de redução dos principais parâmetros			Unidade	Método
	Controle Abiótico	T ₁	%		
pH	5,12	6,87	34,17	-	SMEWW 4500 –H +B
Demandâ Química de Oxigênio (DQO)	33.037,9	16.202,4	49,04	mg O ₂ /L	SMEWW 5220 C
Demandâ Bioquímica de Oxigênio (DBO)	21.930,5	12.083,3	55,09	mg O ₂ /L	SMEWW 5210 B

T₁ = Tempo pós- tratamento (após o 17º dia de crescimento da linhagem *C. elegans* URM6017)

Controle abiótico – mencionado no item 4.3.3.

Esses índices podem ser atribuídos à presença de fungos endógenos contidos no efluente sólido.

Roveda (2007) relatou que houve redução da DBO na saída do aerador, demonstrando que os microrganismos existentes no efluente da indústria de laticínios degradaram a matéria orgânica durante o processo de tratamento biológico.

Durli (2007) afirma que as maiores concentrações de ácidos livres em seu trabalho foram obtidas, aproximadamente, nas primeiras 12 h de incubação, ocorrendo também nesse tempo 70 % da remoção de óleos e graxas, podendo ser atribuído ao crescimento dos micro-organismos contidos no efluente.

Alberton (2009) relatou que houve remoção de óleos e graxas por microrganismos endógenos, durante o ensaio onde utilizou o efluente de laticínio não esterilizado.

5.5. Avaliação da atividade lipolítica das linhagens selecionadas e características físico-químicas do resíduo da indústria de sorvetes

As linhagens selecionadas produziram menor quantidade de lipase (U/mL) quando utilizaram apenas o efluente sólido da indústria de sorvete como indutor, sem adição do azeite de oliva, em comparação ao meio utilizado por Roveda (2007) (Tabela 8).

Tabela 8. Atividade de lipase em U/mL por *C. elegans* URM 5780 e URM6017 em meios de cultura contendo resíduo de sorvete e resíduo de sorvete adicionado de óleo de oliva como nutrientes

Repetições	<i>Cunninghamella elegans</i> 6017			<i>Cunninghamella elegans</i> 5780		
	Abiótico*	Efluente sólido	Azeite de Oliva	Abiótico*	Efluente sólido	Azeite de Oliva
R₁	2,15	2,00	3,87	2,93	2,96	3,88
R₂	2,28	1,87	4,09	3,23	2,29	3,15
R₃	-	2,18	5,89	-	2,95	4,51
Média	2,21	2,01	4,61	3,08	2,73	3,84

*realizado em duplicata
(-) ausência de realização

As maiores atividades foram de 2,18 U/mL por *C. elegans* URM6017 e 2,96 U/mL por *C. elegans* URM5780, quando utilizando o efluente sólido do sorvete. As maiores atividades, quando utilizado o meio padrão, foram de 5,89 U/mL por *C. elegans* URM6017 e 4,51 U/mL por *C. elegans* URM5780, o que confirma a afirmação feita por Dors (2006). Com relação aos controles abióticos, as maiores atividades foram de 2,28 por *C. elegans* URM6017 e de 3,23 por *C. elegans* URM5780. Os resultados das atividades de lipase dos brancos utilizados como padrão para as linhagens *C. elegans* URM6017 e *C. elegans* URM5780 foram 0,34 e 0,29 U/mL, respectivamente.

A utilização do efluente para a produção de lipases é um processo viável e de baixo custo, visto que este apresenta uma elevada carga de nutrientes ainda disponíveis para o crescimento fúngico e a posterior produção de enzimas. As enzimas podem ser indutivas, ou seja, produzidas pelos micro-organismos na presença de um indutor, que pode ser o próprio substrato ou o produto da sua hidrólise, o qual pode ser adicionado ao meio de cultivo, a fim de estimular a produção (ROVEDA et al., 2010).

Dors (2006) utilizou preparações enzimáticas comerciais de origem animal: Lipase pancreatina (LKM) e Lipase pancreatina (LNU) para tratar o efluente da indústria de abate de frango, o qual foi coletado no tanque de equalização. As lipases pancreáticas foram caracterizadas quanto à sua atividade específica em função do pH e da temperatura, realizada frente a dois substratos, o azeite de oliva e o efluente bruto. A concentração de enzima variou de 0,10% a 0,35% (p/v). Nos tempos inicial e final de cada ensaio foram quantificados os parâmetros DQO, pH, ácidos graxos e glicerol. Através dos resultados, pode-se observar que a lipase LNU atingiu a atividade máxima de 3913,33 U.mg⁻¹ em pH

igual a 7.0 e a LKM apresentou atividade máxima de 3320 U.mg^{-1} em pH 8.0 utilizando como substrato o azeite de oliva. Utilizando o efluente bruto, a enzima LNU atingiu uma atividade máxima de 220 U.mg^{-1} em pH igual a 7.5 e a LKM apresentou uma atividade máxima de 580 U.mg^{-1} em pH 7.0. Quanto à atividade, para os ensaios realizados com azeite de oliva como substrato, obtiveram-se valores bem superiores quando comparados com os resultados alcançados com o efluente como substrato.

Os resultados das atividades de lipase encontrados por Dors (2006), no tratamento do efluente da indústria aviária, através da utilização de lipases pancreáticas são bem maiores que os obtidos nos ensaios com o efluente de sorvete. Para a determinação dos resultados foi utilizado o método titulométrico.

Roveda (2007) avaliou a produção de lipases utilizando 21 micro-organismos, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*, isolados de efluentes de laticínios. Os efluentes foram coletados nas saídas do equalizador e do aerador de uma estação de tratamento de efluentes de laticínios da região de Passo Fundo. O isolamento dos micro-organismos foi realizado em dois pontos de coleta, seguido de plaqueamento em meio PDA acidificado. Foram selecionados os fungos com potencial para a produção de lípases, a partir do crescimento em meio PDA contento azeite de oliva como fonte de carbono. Os que apresentaram maiores crescimentos foram utilizados para a produção de lipases via fermentação submersa, onde foram utilizados os efluentes coletados como meios de cultivo, acrescidos de nutrientes. Na fermentação submersa, 3 fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram os que apresentaram as maiores atividades enzimáticas, de $1,250$ a $2,250 \mu\text{molAG/mL.min}$, utilizando como meio de cultivo o efluente coletado na saída do equalizador.

Embora os fungos isolados por Roveda (2007) não pertencerem à classe Zygomycetes, as atividades lipolíticas obtidas em seu trabalho são comparáveis com os resultados obtidos utilizando o efluente sólido de sorvete como fonte de nutrientes, tendo sido utilizado para a determinação de ambos resultados o método titulométrico.

Alberton (2009) trabalhou com a produção de lipase para tratamento de efluente da indústria de laticínios utilizando os processos alternativos das FS e FES. Dos vinte e oito isolados de fungos utilizados, inoculadas em meio BDA (batata, dextrose, ágar) a 30°C , durante 7 dias, somente onze cepas cresceram. Para a seleção de cepas lipolíticas foram utilizados os indutores óleo de oliva 1% (v/v) e Tween 80 0,01% (v/v) em placas de Petri a 30°C por 4 dias. Das 11 cepas fúngicas testadas, 4 apresentaram maior intensidade de

atividade lipolítica através da fluorescência. A produção máxima de lipase partindo de pré-inóculo com indutor, foi de 0,4 U/mL em 12 h de fermentação. Os resultados mostraram que a produção de lipase foi superior quando utilizado pré-inóculo sem o indutor óleo de oliva em 24 h. A produção máxima de lipase se deu com a utilização do farelo de girassol sendo de 4,0 U/gSS em 48 h. No bagaço de cana umedecido com meio de cultura da FS e óleo de oliva 5% (v/v); meio de cultura e sebo de origem animal 5% (v/v); meio de cultura e gordura do efluente 5% (m/v) e efluente de laticínio não houve crescimento fúngico, nem atividade lipolítica. A gordura flutuante do efluente foi coletada na lagoa de equalização.

Os resultados obtidos por Alberton (2009) utilizando o farelo de girassol se comparam aos obtidos com a utilização do resíduo sólido de sorvete. Em ambos ensaios foi utilizado o método titulométrico para determinação.

É importante destacar que a utilização de diferentes substratos interfere sensivelmente na atividade das enzimas, assim como nos valores de pH e temperatura ótimos (DORS, 2006).

A tabela 9 mostra os resultados da análise físico-química dos ensaios com a utilização de azeite de oliva como fonte de nutrientes para a produção de lipase.

Tabela 9. Características físico-químicas do fermentado das linhagens *C. elegans* URM6017 e *C. elegans* URM5780 com 17 dias de crescidas no efluente de sorvete, com e sem adição de azeite de oliva como fonte nutricional

Parâmetros	Controle abiótico		<i>C. elegans</i> URM6017		<i>C. elegans</i> URM5780		Unidade
	RS 15%+água	Azeite de oliva 5% + RS 15%	RS a 15%	Azeite de oliva 5% + RS 15%	RS 15%	Azeite de oliva 5% + RS 15%	
pH	4,97	6,3	7,51	6,48	6,92	7,6	
DQO	45.624,9	27.291,6	28.749,0	3.708,3	18.402,7	6.916,6	mg O ₂ /L
DBO	20.000,0	14.227,7	16.722,2	2.688,8	10.413,2	5.590,0	mg O ₂ /L

RS: Resíduo sólido

Quando ao efluente sólido da indústria de sorvete foi acrescentado o azeite de oliva como indutor, houve uma redução nos valores de DQO e DBO (Tabela 10).

Tabela 10. Percentual de eficiência (%) do tratamento do resíduo da indústria de sorvetes, utilizando azeite de oliva como indutor, com relação à caracterização do efluente

Parâmetros	Controle abiótico		<i>C. elegans</i> URM6017		<i>C. elegans</i> URM5780	
	RS 15%+água	Azeite de oliva 5% + RS 15%	RS 15%	Azeite de oliva 5% + RS 15%	RS 15%	Azeite de oliva 5% + RS 15%
DQO	87,46	92,49	92,09	98,98	94,94	98,09
DBO	89,55	92,57	91,27	98,59	94,56	97,08

RS: Resíduo sólido

Os resultados obtidos na literatura confirmam que a aplicação de enzimas hidrolíticas no pré-tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios é de relevante importância para remoção de compostos orgânicos, antes da etapa de biodegradabilidade anaeróbia.

A Tabela 11 mostra o percentual de eficiência de DQO e DBO obtidos na segunda análise físico química, relacionado aos resultados dos controles abióticos.

Tabela 11. Percentual de eficiência (%) do tratamento do resíduo da indústria de sorvetes, utilizando azeite de oliva como indutor, com relação aos controles abióticos

Parâmetros	Controle abiótico		<i>C. elegans</i> URM6017		<i>C. elegans</i> URM5780	
	RS 15%+água	Azeite de oliva 5% + RS 15%	RS 15%	Azeite de oliva 5% + RS 15%	RS 15%	Azeite de oliva 5% + RS 15%
DQO	45.624,9	27.291,6	36,98	86,41	59,66	74,65
DBO	20.000,0	14.227,7	16,38	81,10	47,93	60,71

RS: Resíduo sólido

6. CONCLUSÕES

- ✓ As linhagens de *Cunninghamella elegans* URM6017 e URM5780 mostram potencial para tratar o efluente sólido (resíduo) da indústria de sorvete;
- ✓ A produção de lipase se deu a partir do 2^a dia – 48h – da inoculação, utilizando o efluente sólido como única fonte de nutrientes;
- ✓ O crescimento máximo ocorreu em 3 dias na concentração de 15% (m/v);
- ✓ Houve igual crescimento para as duas linhagens selecionadas em todas as concentrações testadas;
- ✓ As linhagens selecionadas mostraram-se eficientes na remoção da matéria orgânica contida no efluente sólido do sorvete;
- ✓ Houve redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em 93,69% e da demanda química de oxigênio (DQO) em 95,54% e aumento do pH em 54,38% pela linhagem *C. elegans* URM6017 em meio contendo o efluente sólido, após o 17º dia de tratamento enzimático.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTON, Dayane. Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, p. 20-28, Curitiba, dez. 2009.

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 4. Ed. New York: John Wiley & Sons, p. 869, 1996.

BRUM, L.F.W.; SANTOS JÚNIOR, L.C.O.; BENEDETTI, S. Reaproveitamento de Água de Processo e Resíduos da Indústria de Laticínios. **2nd International Workshop Advances in Cleaner Production**, São Paulo, Brazil, 22 nd, May 20th 2009.

CARVALHO, P.O.; OLIVEIRA, J.G. de; PASTORE, G.M. Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus *Mucor* sp LB-54 by growth temperature. **Rev. Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 170-175, São Paulo, Apr./Jun 1999.

CASTRO H.F; MENDES A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 147-154, 2004.

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.

DEZOTTI, M. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos, Escola Piloto de Engenharia Química COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro: E – Popers, p. 17-19, 2008.

DORS, Gisanara. Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, SC, Brasil, fev 2006.

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

DUEHOLM, T.E.; ANDREASEN, K.H.; NIELSEN, P.H. Transformation of lipids in activated sludge. **Water Sci. Technol.**, v. 43, n. 1, p. 165, 2001.

DURLI, E. Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de *Burkholderia cepacia* LTEB 11. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Área de Concentração em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas, Curitiba, 2007.

FREITAS, Lenis Medeiros de. Avaliação do perfil metabólico da estuvudina através do emprego da bioconversão e da modelagem molecular do citocromo P-450 CYP 3A4. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, p. 46, Goiânia 2009.

FURIGO Jr, A. Enzimas e suas aplicações cinética enzimática. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, p. 4-5, junho 2001.

GIORDANO, Gandhi. Avaliação ambiental de um balneário e estudo de alternativa para controle da poluição utilizando o processo eletrolítico para o tratamento de esgotos. Dissertação (Mestrado) Ciência Ambiental - Universidade Federal Fluminense, p. 137, Niterói – RJ, 1999.

GIORDANO, Gandhi D.Sc. Tratamento e controle de efluentes industriais. Prof. Adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente – UERJ, Diretor Técnico da Tecma-Tecnologia em Meio Ambiente Ltda, p. 5-81, 2004.

HASAN, F.; SHAH A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

JAEGER, K.E; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr Opin Biotechnol**, v. 13, n. 4, p. 390–397, 2002.

JARDIM, W.F.; CANELA, M.C. Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos. **Caderno temático v. 01**, p. 2-3. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química, Laboratório de química ambiental, jun 2004.

LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR., G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wasterwaters. **Braz. J. of Chem. Eng.**, v. 19, p. 175-180, 2002.

LIMA, Marcos Antonio Barbosa de. Aspectos bioquímicos e citoquímicos do Polifosfato em *Cunninghamella elegans*. Dissertação (Mestrado) Biologia de Fungos, Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco, p. 12, Recife 2003.

LIMA, M.A.B. de; NASCIMENTO, A.E. do; SOUZA, W. de; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. de. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. **Braz. J. Microbiol.**, v.34 n.4, São Paulo, Oct./Dec. 2003.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F. Redução do teor de lipídeos presentes em efluentes das indústrias de produtos lácteos empregando lipases pancreáticas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 5, n. 1, jun. 2004.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JR., A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. **Química Nova**, v. 28, n. 2, São Paulo, mar/apr 2005.

MOODY, J.D.; FREEMAN, J.P.; CERNIGLIA, C.E. Biotransformation of doxepin by *Cunninghamella elegans*. Division of Microbiology (J.D.M., C.E.C.) and Division of Chemistry (J.P.F.), National Center for Toxicological Research, U.S. Food and Drug Administration, Jefferson, Arkansas. **Drug metabolism and disposition**, v. 27, n. 10, p. 1157, June 1999.

NAIME, R.; GARCIA, A.C. Utilização de enraizadas no tratamento de efluentes agroindustriais. **Estudos Tecnológicos**, v. 1, n. 2, p. 11, jul/dez 2005.

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

NAKHLA, G.; AL-SABAWI, M.; BASSI, A.; LIU, V.; **J. Harzard. Mater.**, B102, p. 243, 2003.

NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; FALLAVENA, C.B.; CANAL, C.W.; SANTOS, L.R.; RODRIGUES, L.B.; LEÃO, J.A.; PILATTO, F.; NEVES, N.; NASCIMENTO, L.P. Qualidade microbiológica e prevalência de salmonella no processo de tratamento de efluentes de abatedouros avícolas. Simpósio sobre resíduos da produção avícola, Concórdia, SC. Anais. Concórdia: **Embrapa suínos e aves**, p. 74, 2000.

NIREMBERG, L.P.; FERREIRA, M.F. Tratamento de águas residuárias de indústria de laticínios: eficiência e análise de modelos matemáticos do projeto da Nestlé. Universidade Católica de Goiás. Departamento de Engenharia. Engenharia Ambiental, p. 2, 2005.2.

NUNES, Elaine Souza. Aplicação da bioconversão da zidovudina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 na síntese de derivados funcionalizados por carboidratos. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, p. 144, Goiânia 2008.

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.

PUTZKE, J. ; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**, ed. 2, v. 1, p. 168-171, 2004.

RATLEDGE, C. Single cell oils - have they a biotechnological future? **Trends Biotech.**, v. 11, n. 7, p. 278-284, July 1993.

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, part 6, p. 1047-1050, 2002.

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

ROVEDA, M. Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, programa de pós-graduação em engenharia, área de concentração Infra-estrutura e Meio Ambiente, p. 10-28, Passo Fundo, 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. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 1, p. 126-131, Campinas, Jan./Mar. 2010.

RUEGGER, Marcelo José Silveira. Atividade enzimática e produção de ácido gama linolênico (AGL) por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, p. 82, Rio Claro, 2001.

SERGEVA, Ya.E.; GALANINA, L.A.; ANDRIANOVA, D.A.; FEOFIFOVA, E. P. Lipids of Filamentous Fungi as a Material for producing Biodiesel Fuel. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 523–527, 2008.

SILVA, Manuela da. Caracterização de Mucorales (Zigomicetos) através de análise de ácidos graxos / Manuela da Silva. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, p. 8-33, Campinas, SP, 1996.

SOUZA, P.M. Caracterização bioquímica, fisiológica e ultraestrutural do processo de bioassorção do cobre por *Cunninghamella elegans* - UCP 542. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Centro de Ciências Biológicas, p. 8-9, Recife, PE, 2004.

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

TOCCHETTO, M.R.L. Tratamento de efluentes líquidos. QMC 1036 – Química Ambiental e Gerenciamento de Resíduos. Departamento de Química, Santa Maria, RS, p. 15-33, março 2008.

VARGAS, G.D.L.P. Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. Departamento de ciências agrárias, programa de mestrado em engenharia de alimentos, Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil, mar 2004.

VASCONCELOS, W.E. de; RIOS, M.S.; SOUSA, A.H. de; MEDEIROS, E.V. de; SILVA, G.M. da C.; MARACAJÁ, P.B. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, n. 2, 2003/2.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ, F. J.; SADABA I.; RUIZ-VAZQUEZ, R.M., TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 22–27, 2009.

Documentos eletrônicos:

Aplicabilidade da tecnologia anaeróbia para o tratamento de esgotos domésticos. Disponível em <http://www.finep.gov.br/prosab/livros/prosabCarlos/cap-7.pdf>. Acesso em: 09 de junho de 2010.

Guia técnico ambiental de produtos lácteos - série P+L. Disponível em http://www.fiesp.com.br/ambiente/produtos_servicos/downloads/p+l_laticinio.pdf. Acesso em: 24 de abril de 2012.

Lipase. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Lipase>. Acesso em: 11 de junho de 2010.

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

Ácidos graxos. Disponível em <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/lipidios/axidos-graxos.php>. Acesso em: 29 de junho de 2010.

Ômega 3. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%94Ômega_3. Acesso em: 29 de julho de 2010.

GERBER, W. Mercado de tratamento de efluentes industriais no Brasil. Pelotas, RS. Disponível em <http://ecocell.com.br/PDF/Artigo01.pdf>. Acesso em: 06 de agosto de 2010.

RESOLUÇÃO CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, p. 262-279, publicada no Diário Oficial da União, n. 53, Seção 1, p. 58-63, de 18 de março de 2005. Disponível em <http://www.saneago.com.br/novasan/leis/conama.pdf>. Acesso em: 04 de setembro de 2010.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 31 · OUT · 2001. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>. Acesso em: 31 de outubro de 2010.

BRIÃO, V.B.; TAVARES, C.R.G. Geração de efluentes na indústria de laticínios: atitudes preventivas e oportunidades. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Disponível em <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/II-018.pdf>. Acesso em: 31 de outubro de 2010.

DQO - Demanda Química de Oxigênio. Disponível em <http://www.brasilescola.com/quimica/demanda-quimica-oxigenio.htm>. Acesso em: 10 de novembro de 2010.

VILELA, M. L. Tratam. Biológ. res. ind. sorv. por zygomycetes

DQO - Demanda Química de Oxigênio. Disponível em <http://www.mundoeducacao.com.br/quimica/demanda-quimica-oxigenio.htm>. Acesso em: 10 de novembro de 2010.

Resíduos sólidos. Disponível em http://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/3668-resduos-slidos-industriais). Acesso em: 24 de setembro de 2011.

Revistas

Empresas mercados, empresários e executivos. **Negócios PE**. Entendendo Suape, ano IV, Ed. 20, 2011.