



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

SARAH SIGNE DO NASCIMENTO

**TRATAMENTO DE EFLUENTE INDUSTRIAL OLEOSO POR *Cunninghamella
bertholletiae***

RECIFE

2019

SARAH SIGNE DO NASCIMENTO

**TRATAMENTO DE EFLUENTE INDUSTRIAL OLEOSO POR *Cunninghamella*
*bertholletiae***

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 de concentração: Micologia aplicada.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Norma Buarque de Gusmão (UFPE)

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Leonor Alves de Oliveira da Silva (UFPB)

RECIFE

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Nascimento, Sarah Signe do
Tratamento de efluente industrial oleoso por *Cunninghamella
bertholletiae* / Sarah Signe do Nascimento - 2019.
61 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão
Coorientadora: Leonor Alves de Oliveira da Silva
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de
Fungos. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Fungos 2. Biorremediação 3. *Cunninghamella sp*
I. Gusmão, Norma Buarque de (Orientadora) II. Silva, Leonor Alves
de Oliveira da (Coorientadora) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-433

SARAH SIGNE DO NASCIMENTO

**TRATAMENTO DE EFLUENTE INDUSTRIAL OLEOSO POR *Cunninghamella
bertholletiae***

APROVADO EM: 27.02.2019

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.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Norma Buarque de Gusmão (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco (Departamento de Antibióticos - UFPE)

Dr^a. Keila Aparecida Moreira – examinadora interna

Universidade Federal de Pernambuco (Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos – Unidade acadêmica em Garanhuns- UFPE)

Dr. Marcos Barbosa de Lima – Examinador externo

Universidade Federal Rural de Pernambuco (Departamento de Biologia - UFRPE)

Dr^a. Luciana de Oliveira Franco- Examinador externo

Universidade Federal Rural de Pernambuco (Departamento de Biologia - UFRPE)

Dr^a. Cristina de Souza Motta - Examinador interno

Universidade Federal de Pernambuco (Departamento de Micologia - UFPE)

Dedico esse trabalho a minha querida mãe Sônia Nascimento meu maior exemplo na vida, aos familiares e amigos por todo carinho e o incentivo que recebi ao longo da minha história. In memoriam Maria Virgínia, Aqueu Gomes, Elias Mendes e Antônia Alves, amores eternos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me concedido o presente de ter chegado até aqui, saúde, discernimento, forças para enfrentar todos os desafios e resiliência para não desistir, não sei onde estaria se não fosse a Tua graça sobre mim!

Sempre evidenciando a minha mãe Sônia Maria do Nascimento e aos meus irmãos Jonison do Nascimento e Jonas Rosa do Nascimento Júnior; familiares especialmente ao meu avô Damião Domingos, tias e tios: Adriana Domingos, Eliane Mendes, Mônica Mendes, Selma Domingos, Silvânia Domingos, Silvano Domingos, Sérgio Silva e Luiz Mendes; aos que amarei intensamente, *in memoriam* as minhas avós Maria Virginia e Antônia Alves e tios Aqueu Gomes e Elias Mendes, imagino o quando estariam orgulhosos de mim nesse momento.

As minhas orientadoras prof^a Dr^a Norma Buarque de Gusmão e prof^a Dr^o Leonor Alves de Oliveira da Silva, por confiarem a mim esse trabalho, estando solícitas sempre. As minhas queridas professoras, Mrs^a Lúcia Roberta e Dr^a Fabiana Américo, pelo carinho, tenho por vocês admiração imensa.

Agradecendo sempre a empresa de fomento fornecedora da bolsa, a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), ao Departamento do Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial (LAMAI) na qual realizei grande parte dos meus experimentos, aos laboratórios colaboradores o Departamento de Engenharia Química da UFPE e as coleções de cultura, à Micoteca URM e Coleção de Cultura da Universidade Católica de Pernambuco.

Aos amigos, agradeço de coração pelo companheirismo, descontração e crescimento cognitivo, em especial aos guerreiros da minha turma de Mestrado 2017 (Amanda Lúcia, Amanda Cupertino, Lidiane Alves, Ianca Albuquerque, Felipe Barbosa); no meu laboratório (Wellma Oliveira, Eduardo Marques, Hugo Galindo, Vitória Santiago, Emanuella Maria, Patrícia Barbosa, Diana Duarte, Helton Santana, Thalles Henrique, Ivana Luiza e Carlos Vasconcelos) e as lindas Jeoadã Karoline, Adriana Yan, Evelyn Rodrigues, Athaline Diniz, Katilane Gervázio, Ana Carla, Betânia Macena, Iasmim Lucas, Adriana Souza e Laís Mirelle.

Por fim, a todos os que oram e torcem pelo meu futuro; dando-me abraços calorosos e palavras de ânimo, força e esperança.

A todos os meus sinceros agradecimentos, amo a todos!

*“Quando o homem cortar a última árvore,
envenenar o último peixe e secar o último
rio, então, ele vai aprender que não se pode
comer o dinheiro”. (Autor desconhecido)*

RESUMO

A capacidade de adaptação metabólica dos micro-organismos, especialmente os fungos a diferentes fontes de carbono e nitrogênio, são fatores essenciais para a sua sobrevivência. Nos processos biotecnológicos, na área ambiental, a capacidade fisiológica dos fungos em sintetizar enzimas e excretá-las ao meio facilita a remediação de ambientes poluídos. Neste trabalho foram utilizados 12 cepas fúngicas, entre elas, as pertencentes aos gêneros *Rhizopus* sp., *Cunninghamella* sp., *Mucor*., *Lichtheimia* sp., *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp. As cepas citadas foram testadas frente a dois tipos de efluentes industriais oleosos, provenientes da lavagem de bombonas com óleo de fritura, nas concentrações de 1, 3 e 5%, usando como critério de seleção à capacidade de crescimento dos fungos filamentosos nos efluentes. Das cepas testadas as que se destacaram com maior atividade lipolítica foi a *Cunninghamella bertholletiae* com 5,514 U/g, seguida por *Rhizopus microsporus* (URM 7652) com 5,376 U/g, *C. echinulata* (URM 7660) com 4,805 U/g e *R. arrhizus* (URM 7654) com 4,342 U/g. As análises das biomassas através da cromatografia apresentam a prevalência dos seguintes ácidos graxos: palmítico, linoléico e oléico, o que caracteriza a produção de biodiesel de origem microbiana. A cepa que se destacou como a maior produtora lipolítica, foi selecionada para ser testada em biorreatores e o líquido metabólico foi usado para análises de fitotoxicidade com sementes de *Cucumis sativus*. Para avaliação dos ácidos graxos na biomassa fúngica foram realizadas extrações de lipídios totais e quantificação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. A *C. bertholletiae* destacou-se entre as espécies testadas como a maior produtora lipolítica, sendo usada para o tratamento enzimático em biorreatores observou-se que os resultados estavam acima de 85% para DBO e 77% para DQO, com 91% para o Índice de Germinação no teste de fitotoxicidade, considerado não tóxico. Os resultados atendem as exigências dos órgãos ambientais e demonstram um grande potencial para uso industrial e na remediação de efluentes contaminados com óleo de fritura.

Palavra-chave: Biorremediação. *Cunninghamella* sp. Efluente Oleoso. Fitotoxicidade. Lipases

ABSTRACT

The metabolic adaptability of microorganisms, especially fungi to different sources of carbon and nitrogen, are essential factors for their survival. In biotechnological processes, in the environmental area, the physiological ability of fungi to synthesize enzymes and excrete them in the environment facilitates the remediation of polluted environments. Twelve fungal strains were used in this work, among them the genera *Rhizopus* sp., *Cunninghamella* sp., *Mucor* sp., *Lichtheimia* sp., *Trichoderma* sp. and *Penicillium* sp. The strains mentioned were tested against two types of oily industrial effluents, from the washing of frying pails, at concentrations of 1, 3 and 5%, using as selection criteria the growth capacity of filamentous fungi in the effluents. *Cunninghamella bertholletiae* with 5.514 U / g, followed by *Rhizopus microsporus* (URM 7652) with 5.376 U / g, *C. echinulata* (URM 7660) with 4.805 U / g and *R. arrhizus* (URM 7654) at 4.342 U / g. Biomass analyzes by chromatography show the prevalence of the following fatty acids: palmitic, linoleic and oleic, which characterize the production of biodiesel of microbial origin. The strain that stood out as the largest lipolytic producer was selected to be tested in bioreactors and the metabolic liquid was used for phytotoxicity analyzes with *Cucumis sativus* seeds. To evaluate fatty acids in fungal biomass total lipid extractions and fatty acid quantification were performed by gas chromatography. *C. bertholletiae* stood out among the species tested as the largest lipolytic producer, being used for enzymatic treatment in bioreactors it was observed that the results were above 85% for BOD and 77% for COD, with 91% for the Index. Of Germination in the phytotoxicity test, considered non-toxic. The results meet the requirements of environmental agencies and demonstrate great potential for industrial use and for the remediation of frying oil contaminated effluents.

Keywords: Bioremediation. *Cunninghamella*. Oily Effluent. Phytotoxicity. Lipases

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Complexo enzima-substrato	27
Figura 2-	Representação esquemática das reações catalisadas por lipases	29
Figura 3-	Efluentes industriais oleosos, provenientes da lavagem de bombonas com óleo de fritura	36
Figura 4-	Atividade lipolítica nas concentrações de 1, 3, e 5% do efluente 1	41
Figura 5-	Atividade lipolítica nas concentrações de 1, 3, e 5% do efluente 2	42
Figura 6-	Média do crescimento das raízes de <i>Cucumis sativus</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação internacional das enzimas	26
Tabela 2-	Algumas aplicações industriais das enzimas	28
Tabela 3-	Aplicações industriais das lipases	30
Tabela 4-	Micro-organismos produtores de lipases relatados na literatura (1965-2011)	31
Tabela 5-	Fungos filamentosos oriundos do solo da Caatinga e azulejos da Academia Pernambucana de Letras de Pernambuco	35
Tabela 6-	Ensaio dos biorreatores com <i>Cunninghamella bertholletiae</i>	43
Tabela 7-	Produção de atividade lipolítica pela <i>Cunninghamella bertholletiae</i> em biorreatores com diferentes composições de substratos	43
Tabela 8-	Teste de fitotoxicidade com sementes de <i>Cucumis sativus</i> e o líquido metabólico dos biorreatores	44
Tabela 9-	Resultado da extração de lipídios totais, de micro-organismos crescidos no meio contendo o efluente 1, de acordo com o método descrito por Manocha <i>et al.</i> , 1980.....	44
Tabela 10-	Quantificação dos ácidos graxos da biomassa fúngica	45

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda Química de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ETE's	Estações de Tratamento de Esgotos
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
IUB	União Internacional de Bioquímica
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
OGRs	Óleos e Graxas Residuais
SISNAMA	Sistema Nacional do Meio Ambiente
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil
SUASA	Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo geral	16
1.1.2	Objetivos específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	EFLUENTE	17
2.1.1	Legislação ambiental para descarte de resíduos	17
2.2	EFLUENTES OLEOSOS	19
2.2.1	Consequências ambientais do descarte inadequado dos efluentes	19
2.3	TRATAMENTOS CONVENCIONAIS PARA EFLUENTES	20
2.3.1	Matéria orgânica	23
2.4	ENZIMAS	24
2.4.1	Classificações das enzimas	25
2.4.2	Principais reações enzimáticas	26
2.4.3	O mercado das enzimas no mundo	27
2.4.4	Lipases	29
2.4.5	Micro-organismos oleaginosos	32
2.5	PRODUÇÃO DE BIODIESEL	33
3	METODOLOGIA	35
3.1	FUNGOS FILAMENTOSOS	35
3.2	AMOSTRAS DE EFLUENTE	35
3.3	SELEÇÃO DE LINHAGENS	36
3.4	ATIVIDADE LIPOLÍTICA	37
3.5	TRATAMENTO DO EFLUENTE UTILIZANDO BIORREACTORES	38
3.6	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LÍPIDIOS TOTAIS	39
3.7	METILAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	39
3.8	AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE	40
4	RESULTADOS	41
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE BRUTO	41
4.2	SELEÇÃO DAS LINHAGENS	41
4.3	BIORREACTORES	42
4.4	TESTE DE FITOTOXICIDADE	43
4.5	EXTRAÇÃO DE LÍPIDIOS TOTAIS	44
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE LÍPIDIOS	45

5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXO A - MEIOS DE CULTURA.....	60

1 INTRODUÇÃO

Os efluentes industriais, sejam eles líquidos ou sólidos, são um grande problema para o meio ambiente, devido à complexidade dos compostos neles presentes. Dentre os efluentes, os óleos e graxos residuais (OGRs) são provenientes de estabelecimentos alimentares, domésticos e comerciais; que geram grandes volumes desses compostos. Os resíduos alimentares contêm uma grande quantidade de lipídios, esses compostos químicos orgânicos naturais podem ser encontrados em todos os tecidos animais, principalmente nas células de gordura e nas membranas celulares de diversos organismos incluindo os microscópicos (SANTOS *et al.*, 2009; BELO, 2009; JAISWAT, *et al.*, 2017).

Os lipídios são um grupo heterogêneo de compostos incluindo gorduras, óleos, esteróis, ceras e compostos relacionados; podendo ser classificados em: saponificáveis e não saponificáveis. E nos processos biotecnológicos na área ambiental, a utilização de bactérias, fungos e /ou enzimas se destacam como uma alternativa à biorremediação de ambientes contaminados por óleos (DUFRECHE, *et al.*, 2007; CARVALHO, *et al.*, 2014; OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas degradadoras de lipídios, possuem utilidade industrial e realizam as seguintes reações de: hidrólise, esterificação, interesterificação e transesterificação quando em ambientes com escassez de água (RODRIGUES, 2015). Tanto para as lipases quanto para outras enzimas, da engenharia genética, da enzimologia e sua ampla utilização, biodegradadores, biossensores, biodiesel, cosméticos, detergentes, indústrias alimentícias, indústrias de processados de aves e couros, fármacos, tratamento de efluentes entre outras aplicações (MENDES *et al.*, 2005; ALBERTON *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2014; JAISWAT, *et al.*, 2017).

As lipases microbianas apresentam maior interesse em aplicações industriais por serem mais estáveis, não requererem cofatores, apresentarem ampla especificidade a substratos e alta enantiosseletividade (CONTESINI *et al.*, 2010; GRIEBELER *et al.*, 2011). Muitos microorganismos são conhecidos como produtores de lipases extracelulares, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (TREICHEL *et al.*, 2010; RABBANI *et al.*, 2013).

A capacidade dos fungos de adaptarem o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia é um fator essencial para a sua sobrevivência. Essa flexibilidade metabólica

se deve a síntese enzimática, ao fato de possuírem hifas que penetrem no substrato e degradem o poluente, levando a remediação do ambiente (JAEGER *et al.*, 2002; HASAN *et al.*, 2006; AMARA *et al.*, 2009; VICENTE *et al.*, 2009; NIGAN, 2013; CHRITTOPHER, *et al.*, 2014, JAISWAT, *et al.*, 2017).

As enzimas podem ser intra ou extracelulares e cepas distintas do mesmo micro-organismo podem apresentar diferentes propriedades enzimáticas. A purificação de produtos obtidos através de processos microbianos constitui uma etapa complexa, devido à quantidade de técnicas utilizadas e fatores variantes que determinam qual método deve ser empregado. Isto porque a produção enzimática está ligada às variações das biomoléculas, dos meios de interesse e características das enzimas, do grau de pureza que varia de acordo com sua aplicação industrial (PESSOA JR. & KILIKIAN, 2005; SINGH *et al.*, 2016).

Os fungos produzem em maior quantidade as enzimas extracelulares, devido ao tipo de digestão ser extracorpórea por absorção. Para a indústria a utilização de enzimas extracelulares é mais viável, devido aos tipos de processos de extração enzimática, sendo mais rentável do que as intracelulares.

Neste contexto, foi proposto ao presente trabalho a seleção de micro-organismos para a produção de lipase e determinação dos ácidos graxos dos micélios, usando como meio de cultura alternativo o efluente de lavagem de bombonas contendo óleo de fritura, para a remediação de ambientes impactados com óleo e produção de biodiesel.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar fungos filamentosos com potencial para tratamento em efluente de lavagem de bombonas contendo óleo de fritura, determinar a produção de lipase extracelular e ácido graxos do micélio.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar de fungos filamentosos com capacidade de crescimento em meios contendo o efluente;
- ✓ Detectar a produção de lipase por fungos;
- ✓ Quantificar a produção de lipase por espécies de fungos crescidos em meio contendo o efluente;
- ✓ Tratar o efluente em biorreatores;
- ✓ Determinar a toxicidade dos subprodutos do processo de tratamento do efluente;
- ✓ Caracterizar os ácidos graxos dos fungos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EFLUENTE

O termo resíduo engloba não somente sólidos como também os efluentes líquidos, além dos materiais presentes nas emissões atmosféricas. Depois de gerados, os resíduos, necessitam de destino adequado, pois não podem ser acumulados infinitamente no local onde foram produzidos, nem tão pouco lançados nas águas ou no solo sem tratamento (HOORNWEG & BRADA-TATA, 2012; SILVA, 2016).

A legislação ambiental estabelece referências para serem seguidas por setores industriais e domésticos, evitando a poluição do ambiente. O setor industrial tem trabalhado com o aproveitamento desses resíduos como matéria prima, transformando-o num produto com valor agregado (BRASIL, 2010).

Em 2012, Hoornweg & Brada-Tata, realizaram uma pesquisa dos resíduos sólidos urbanos e constataram que era gerado no mundo cerca de 1,3 bilhões de toneladas métricas de resíduos sólidos urbanos (RSU), este montante deveria aumentar cerca de 2,2 bilhões de toneladas até 2025. O RSU contém uma quantidade considerável de resíduos alimentares onde são parte dos resíduos sólidos urbanos obtidos nas cozinhas de residências, restaurantes, albergues, cantinas e indústrias alimentícias.

Os resíduos de alimentos contêm uma grande quantidade de lipídios. Os lipídios são um grupo heterogêneo de compostos incluindo gorduras, óleos, esteróis, ceras e seus derivados. Eles são classificados em não saponificáveis, quando não contêm ácidos graxos em sua composição, tem como principais representantes as vitaminas lipossolúveis e o colesterol; já os saponificáveis contêm um ou mais grupos éster que permitem hidrólise na presença de um ácido, de uma base ou de uma enzima (SIPRA & KAKOLI, 2017).

2.1.1 Legislação ambiental para descarte de resíduos

A disposição dos resíduos no ambiente, por meio de emissões de matérias e de energias lançados nas águas ou no solo devem ocorrer após sofrerem tratamento e serem

enquadrados nos padrões estabilizados na legislação ambiental brasileira. A Resolução de nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 17 de março de 2005, alterada pelas resoluções 410/2009 e 430/2011; para não causarem poluição e danos maiores ao meio ambiente, serão permitidos até 20 mg.L^{-1} para a concentração de óleo mineral e até 50 mg.L^{-1} de óleos e gorduras vegetais e animais. Esses materiais não aproveitados em atividades humanas podem ser provenientes de setores industriais, comerciais, hospitalares e residenciais (CONAMA, 2011).

Por conseguinte os resíduos são um grande problema ambiental, sanitário e econômico devido às despesas relacionadas à descontaminação das áreas por ele afetadas, sendo, portanto necessárias buscas por um tratamento e a destinação adequada. A legislação brasileira sancionou leis que regem a destinação adequada desses resíduos, protegendo tanto o ambiente quanto os seres vivos. Na Lei Nº 12.305, de 02 de Agosto de 2010; foi instituída a política Nacional de Resíduos, que altera a lei Nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências, bem como:

Art 3º, inciso VII - destinação final ambientalmente adequada: destinação de resíduos que inclui a reutilização, a reciclagem, a compostagem, a recuperação e o aproveitamento energético ou outras destinações admitidas pelos órgãos competentes do SISNAMA, do SNVS e do SUASA, entre elas a disposição final; observando normas operacionais específicas de modo a evitar danos ou riscos à saúde pública e à segurança, e a minimizar os impactos ambientais adversos (BRASIL, 2010).

Quanto ao lançamento dos subprodutos gerados após terem sido cumpridas as exigências estabelecidas pela legislação e descarte dos resíduos:

Art 3º, inciso XV - rejeitos: resíduos sólidos que, depois de esgotadas todas as possibilidades de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis, não apresentem outra possibilidade que não a disposição final ambientalmente adequada (BRASIL, 2010).

2.2 EFLUENTES OLEOSOS

Os óleos são substâncias viscosas e líquidas a temperatura ambiente, podendo ser extraídos de plantas, sementes, animais ou minerais, com utilização em vários segmentos industriais, tais como automobilísticos, alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (CARVALHO *et al.*, 2014).

Os óleos e graxas residuais (OGRs) são provenientes de estabelecimentos alimentares, domésticos e comerciais; que geram grandes volumes de efluentes, que antes de entrar em contato com o sistema de coleta e tratamento, devem ser removidos devido a problemas como entupimento das linhas de esgoto, assim reduzindo a eficiência dos processos de tratamentos residuais (JAEGER *et al.*, 2002; HASAN *et al.*, 2006; VICENTE *et al.*, 2009; AMARA *et al.*, 2009; BRASIL, 2010; HOORNWEG & BRADA-TATA, 2012; NIGAN, 2013; CHRISTOPHER *et al.*, 2014; SILVA, 2016).

2.2.1 Consequências ambientais do descarte inadequado dos efluentes

O lançamento sem tratamento prévio nos corpos hídricos geram diversos tipos de alterações ambientais; como aumento do DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) na água, que formam películas de lipídios que impedem a penetração de luz solar, alteram a quantidade de oxigênio dissolvido no meio, aumentam a temperatura e a concentração de sólidos solúveis, proliferação de doenças veiculadas a água; são alguns dos exemplos das consequências geradas por esse desequilíbrio (MENDES *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2009; BELO, 2009; MONTEFRIIO, 2010; ZAWADZKI, 2011; BARANA *et al.*, 2012).

O tratamento de efluentes é fundamental para a preservação do meio ambiente, melhoramento da qualidade de vida humana e reutilização de recursos não renováveis; isso faz com que sejam geradas legislações, que tendem a regulamentar as indústrias no descarte de efluentes em águas e solos, estimulando novos conceitos e práticas sustentáveis para o tratamento desses resíduos (CARVALHO *et al.*, 2014; SILVA, 2016).

O tratamento de águas residuais domésticas é dificultado devido a grande presença de OGRs que se caracterizam como uma considerável fonte de contaminante do solo e de

recursos hídricos. Os lipídios (ou gorduras) presentes nesta suspensão são ésteres com alto peso molecular, formados por ácidos graxos superiores com longas cadeias carbônicas (C12 e C22) e glicerol. A baixa solubilidade em água das longas cadeias carbônicas provoca o entupimento nas tubulações, por incrustação de resíduos nas estações de tratamentos de efluentes (ETE's) (BRASIL, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2013; JAISWAT *et al.*, 2017).

Uma das maneiras mais convencionais de minimização dos problemas causadas pelo acúmulo da OGRs é a instalação da caixa de gordura, um dos componentes do sistema de esgoto; instalados em residências e estabelecimentos alimentícios; que se configura como um pequeno tanque que retém os OGRs lançados na pia ou oriundos de máquinas de lavar louças. Todo o efluente que desce pelo encanamento passa por elas, antes de ser lançada do sistema coletar da rua (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A presença desse componente é de extrema importância, já que em baixas temperaturas a gordura se solidifica acumulando-se nos canos, entupindo e reduzindo o espaço de passagem do esgoto. O material que se acumula nessas caixas recebe o nome de espuma, resultados do acúmulo de compostos flutuantes, como graxas, óleos, gorduras, sabões, resíduo alimentar e outras partículas (MENDES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Devido aos altos teores de OGRs a espuma possui elevado potencial para ser utilizado como matéria-prima na produção de biodiesel. Além da espuma, pesquisas recentes revelam que o lodo do esgoto também possui quantidades significativas de lipídios, uma fonte inexplorada de matéria-prima barata com potencial para fabricação de biodiesel; sendo assim, se tornando como uma fonte alternativa de minimização de impactos ambientais ocasionados pelos resíduos dessa natureza (DUFRECHE *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Nas estações de tratamento de águas residuais dos Estados Unidos, por ano geram-se em torno de $6,2 \times 10^6$ toneladas de lodo de esgoto. Com esse montante, os pesquisadores concluíram que se equiparem 50% das estações de tratamento de águas residuais da EUA, com métodos de extração e transesterificação de lipídios; podem gerar em média a 1,8 bilhões de galões ao ano, cerca de $1,4 \times 10^6$ m³/ano, o suficiente para substituir 0,5% da demanda nacional de diesel de petróleo ($0,7 \times 10^6$ m³) (DUFRECH *et al.*, 2007).

2.3 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS PARA EFLUENTES

O tratamento do efluente é de extrema importância para a preservação do ambiente, manutenção dos recursos não renováveis e melhoramento das condições de qualidade de vida dos seres vivos.

A legislação ambiental brasileira estabelece através do CONAMA leis para regulamentar os tipos de tratamento para os resíduos antes de serem lançados no ambiente, seja no solo ou na água; na tentativa de minimização de danos maiores a natureza, onde cada tipo de resíduo tem um padrão de referência máximo de poluente permitido, com penalidades que vão desde pagamentos de multas a prisão dos administradores das empresas que não seguirem as normativas (CONAMA, 2011).

Para selecionar a melhor técnica para o tratamento do efluente, são levados em consideração alguns parâmetros, como: origem do resíduo, área disponível para implantação do sistema de tratamento, a qualidade final do produto, legislação e viabilidade técnica econômica (MENDES *et al.*, 2005).

Existem vários modelos de infraestruturas para as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR's) ou Efluentes (ETE's) que possuem a função de tratar o esgoto sanitário, provenientes do uso doméstico e/ou industrial; que antes que seja lançado no meio ambiente devem seguir as recomendações da legislação ambiental. Nas estações de tratamento os efluentes passam por diversos processos, que objetivam a eliminação ou diminuição na matéria poluente presente na água (OLIVEIRA, 2005).

Normalmente, nas estações os tratamentos ocorrem em 4 etapas:

No tratamento preliminar ou pré-tratamento, o efluente passa pelos seguintes processos: o gradeamento, desengorduramento e a desarenação; tendo como finalidade a separação dos sólidos evitando assim os danos aos dispositivos ao longo da ETAR, por exemplo: bombas, corpos receptores, tubulações e unidades subsequentes. Neste processo ocorrem à remoção grosseira dos materiais sólidos, como fibras, areia, pedras e plásticos. O desengorduramento ocorre através de caixas de gorduras ou pré-decantadores e a desarenação removem flocos de areia através da sedimentação evitando obstrução nos tanques, tubulações, orifícios e sifões facilitando o transporte do líquido (METCALF, EDDY, 2003; TAE, 2015).

Após o pré-tratamento, o efluente tem um aspecto razoável, mas as suas condições da carga poluidora não sofreram nenhum tipo de alteração, esse processo é constituído por tratamento físico-químico do efluente e possui o objetivo de remover as suspensões

sedimentáveis e parte orgânica suspensa. O efluente fica em um tanque e são adicionados produtos químicos para equalização e neutralização da carga. Em seguida são submetidos ao processo de floculação, onde as partículas se agrupam para remoção das matérias suspensas. Ao final desses processos ocorre a decantação primária, que objetiva a separação entre o lodo primário (parte sólida) e o efluente bruto (parte líquida); como resultado dessa etapa obtém a formação de coloides, caracterizados como partículas poluentes menores que permanecem na água (ZAWADZKI, 2011; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2011).

Para essa etapa basicamente constituída de processos bioquímicos, com o lodo ativado e filtro biológico, atuando de formas aeróbicas ou anaeróbicas, tendo como principal finalidade a remoção das partículas suspensas em menor dimensão (os coloides) geradas no tratamento primário. A partir dessa etapa caso tenha sido executada com excelência respeitando os parâmetros exigidos na legislação ambiental, já serão obtidos efluentes com carga nociva mínima, permitindo assim o seu descarte no meio ambiente (SINGH *et al.*, 2016).

Nos processos anaeróbicos ocorre à ação de micro-organismos e realiza a degradação das partículas em suspensão dentro dos tanques de aeração, eles se alimentam dessa matéria orgânica e convertem, principalmente, em gás carbônico e água; para esse tipo de tratamento são utilizados lagoas anaeróbicas, tanques sépticos e filtros anaeróbicos. Já nos processos aeróbicos são usados micro-organismos que necessitam de forma total ou facultativa de oxigênio para sua sobrevivência e são utilizadas lagoas aeróbicas, filtros biológicos. O efluente sai desse processo dependendo da ETE com 95% na eficiência do tratamento (VON SPELING, 2005).

Em seguida o efluente passa pelos tanques de decantação para que ocorra a clarificação, esse processo tem como objetivo a separação dos sólidos no tanque de aeração e sedimentação dos sólidos no fundo do tanque formando o lodo mais concentrado (ZAWADZKI, 2011).

Após essa etapa o efluente gerado pode ser utilizado para fins não potáveis como lavagem de ruas, aguar jardins, uso em descargas; isso é mesmo depois de tratado, essa água pode ter micro-organismos patogênicos e substâncias como nitrogênio e fósforo. Esse processo tem com objetivo a remoção dessas substâncias através de filtrados, cloração, carvão ativado, ozonificação, osmose reversa, troca iônica, eletrodialise, entre outros processos.

Nessa etapa do processo o principal objetivo é desinfecção do clarificado, com a eliminação seletiva de micro-organismos patogênicos (BALAN, 2002).

2.3.1 Matéria orgânica

Durante o tratamento do efluente é gerado um biogás onde já existem vários estudos para o seu aproveitamento como combustível para automóveis, energia elétrica, gás de uso doméstico e industrial. Nas estações são realizadas análises das características físico-químicas após o tratamento, como:

A matéria orgânica que está presente nos corpos hídricos e no esgoto possui fundamental importância sendo um indicador da poluição da água, estando diretamente ligados ao consumo de oxigênio pelos micro-organismos em seus processos metabólicos para estabilizar a matéria orgânica. A matéria orgânica pode ser dividida em: biodegradável e não biodegradável estando suspensas ou dissolvidas. Existem métodos indiretos para quantificação da matéria orgânica ou de carga de potencial poluidor, estão compreendidas em: DQO (Demanda Química de Oxigênio), DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) para medição de oxigênio e COT (Carbonos Totais) para consumo de carbono (VON SPELING, 2005).

A poluição orgânica nos cursos d'água causa um dos principais efeitos ecológicos, a diminuição da quantidade de oxigênio dissolvido. Nos processos aeróbicos, faz-se necessária a adequação para que os micro-organismos tenham o oxigênio necessário para realizar os seus processos metabólicos e estabilizar a matéria orgânica. A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) refere-se a quantidade de oxigênio requerida para estabilizar, através de processos bioquímicos, a matéria orgânica. Atuando como um indicativo indireto, do carbono orgânico biodegradável (ZAWADZKI, 2011).

A estabilidade demora cerca de 20 dias, chamada de Demanda Última de Oxigênio (DBO_u). Entretanto visando a funcionalidade desse teste nos ambientes laboratoriais, foi realizada uma padronização, convencionou-se a análise em 5º dia; o quinto dia pode ser relacionado com o consumo do teste total, determinou-se ainda a temperatura ideal para 20°C, já que temperaturas diferentes podem interferir negativamente no metabolismo bacteriano, trata-se dessa forma da DBO padrão DBO_5^{20} (VON SPELING, 2005).

No caso dos esgotos, alguns aspectos particulares fazem com que esse teste sofra algumas modificações. Os esgotos possuem muita matéria orgânica que é consumida bem antes dos 5 dias (padrão) no oxigênio dissolvido no meio líquido; assim são necessárias serem feitas diluições para reduzir a concentração de matéria orgânica, na tentativa de tornar o consumo de oxigênio a 5 dias. Os esgotos domésticos possuem ordem de DBO a 300mg/l, significa dizer que 1 litro de esgoto consome aproximadamente 300mg de oxigênio em 5 dias, no processo de estabilização (SINGH *et al.*, 2016).

O teste de DQO mede o consumo do oxigênio no processo de oxidação química da matéria orgânica. Na DBO a oxidação bioquímica ocorre unicamente por intermédio dos micro-organismos, o que difere da DQO que corresponde a oxidação química da matéria orgânica, a reação ocorre em meio ácido na presença de um oxidante (dicromato de potássio). Tem como principal vantagem o tempo gasto para a realização do teste de até 3 horas para ser realizado e não tem interferência com a nitrificação. Apresentam como desvantagens, interferências da matéria inorgânica que altera o resultado do teste e o consumo do oxigênio é superior do que o valor real, devido à oxidação da fração inerte junto com a biodegradável (VON SPELING, 2005).

2.4 ENZIMAS

Grande parte da história da bioquímica esta relacionada às pesquisas sobre enzimas, umas das mais conhecidas e descritas foi no final de 1700, em estudos sobre as secreções estomacais na digestão de carne. Por volta de 1850, Louis Pasteur concluiu que leveduras fermentavam o açúcar em álcool, denominado por ele de “fermentos” e eram inseparáveis das estruturas das células vivas (NELSON & COX, 2008).

Em 1897, Eduard Buchner descreveu que extratos de leveduras poderiam fermentar o açúcar em álcool e provou ainda que esse processo de fermentação era feito por moléculas e que permaneciam ativas, mesmo após a retirada das células, derrubando assim a teoria inicialmente proposta por Louis Pasteur. Frederick W. Kuhne nomeou as moléculas descritas por Buchner em 1897, como enzimas (CHAMPE *et al.*, 1996).

O isolamento e a cristalização da urease marcaram o início de novos estudos sobre enzimas, em 1926, por James Sumner com a descoberta de que os cristais eram formados de proteínas, concluindo que toda enzima é uma proteína. Na década de 1930, os estudos de Sumner foram aceitos, após John Northrop e Moses Kunitz cristalizarem peptona, triptona e

outras enzimas digestivas. No século XX, as enzimas passaram a ser purificadas e a ter suas estruturas e funcionamentos esclarecidos (NELSON & COX, 2014).

2.4.1 Classificações das enzimas

Enzimas são polímeros biológicos com capacidade de catalisação de substâncias, são de natureza protéica, mas também podem possuir enzimas constituídas por RNA, denominadas de ribozimas, com atividade tanto intra como extracelulares. Sendo de fundamental importância para os processos fisiológicos que acontecem nos seres vivos, atuando tanto para a saúde como para as doenças relacionadas ao seu desequilíbrio (NELSON & COX, 2008).

As enzimas são classificadas pelo tipo de reação e mecanismos de atuação. Inicialmente, foram identificadas com o sufixo – ase ao nome do substrato ou substância catalisada por ela, como por exemplo, lipases que hidrolisam gorduras (do grego *lipo*) e amilases que hidrolisam amido (do grego *amylon*); embora muitas dessas terminações sejam usadas até o presente momento, outros critérios então sendo adotados. Vários tipos de enzimas foram descobertas por catalisarem diferentes reações usando o mesmo substrato. Por exemplo, nas reações de transferências de grupos temos as transferases, para remoção de hidrogênio são usadas as desidrogenases; os padrões de nomenclatura são determinados pela União Internacional de bioquímica (UIB) (NELSON & COX, 2014).

A União Internacional de bioquímica e Biologia Molecular criaram um sistema de nomenclatura para as enzimas, divididas em: seis classes, cada uma com uma subclasse, com base nos tipos de reações que catalisam, desta maneira cada enzima possui um código específico, o número da Comissão de Enzimas (E. C., do inglês *Enzyme Commission*) (tabela 1) (IBMB, 2018).

Seguem a seguinte ordem dos dígitos:

Lipase E. C. 3.1.1.3 (Primeiro (3), o tipo de reação quanto à classe (hidrolases); segundo (1), sub-classe (atuam sobre ligações ésteres); terceiro (1), sub-subclasse (hidrolisam ligações de ésteres carboxílicos) e quarto (3), enzima específica (nome aceito: triacilglicerol lipase) (IBMB, 2018).

Tabela 1- Classificação internacional das enzimas

Classe Nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons híbridos ou átomos de H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos.
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água).
4	Liases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares.

FONTE: (NELSON & COX, 2014)

2.4.2 Principais reações enzimáticas

É essencial para o funcionamento dos seres vivos as reações enzimáticas. Nas condições biológicas esses processos tendem a ser lentos; reações vitais como digestão dos alimentos, contrações musculares e impulsos nervosos não ocorreriam na velocidade necessária sem as enzimas. Os catalisadores são substâncias, que aceleram a velocidade e reduzem a energia da reação e não são consumidos no processo CASTRO *et al.*, 2004; KAMUR *et al.*, 2005; HASAN *et al.*, 2006; MARTINS, 2008; CONTESINI *et al.*, 2010; TREICHEL *et al.*, 2010; GRIEBELER *et al.*, 2011; POPPE, 2012).

As enzimas possuem um ambiente específico para as ligações, denominado de sítio ativo. As moléculas que se ligarem no sítio ativo, são denominadas de substratos e convertidas em outra denominada de produto; extremamente específicas na reação, uma enzima catalisa apenas um tipo de reação química (FIGURA 1) (NELSON & COX, 2014).

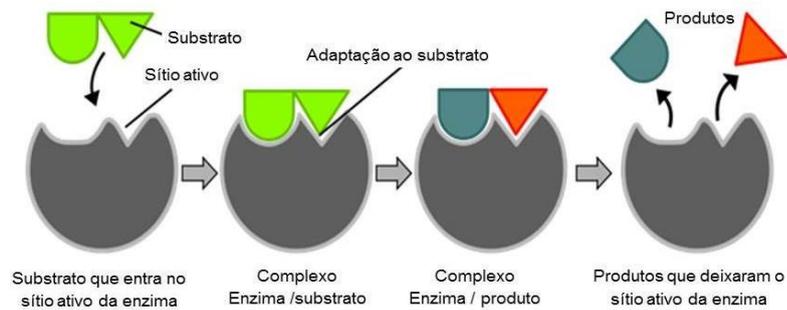


FIGURA 1- Complexo enzima-substrato foi descrito por Charles-Adolphe Wurtz em 1880.

2.4.3 O mercado das enzimas no mundo

As reações enzimáticas estão presentes em todos os tipos e organismos vivos e são fontes viáveis para a utilização industrial, através de reações de biotransformação com eficiência (OLIVEIRA, 2009; ALMEIDA, 2012).

O mercado de alimentos é um dos maiores usuários de enzimas, sabe-se que 4.000 tipos de enzimas garantem em torno de 200 aplicações biotecnológicas; atuando em diversos processos para aumentar a especificidade e eficiência orgânica, reduzir os gastos com insumos e os impactos ambientais. (KAMUR, 2014; DIA DE CAMPO, 2015).

O mercado global enzimático tem crescido significativamente nos últimos anos e a indústria de comercialização de lipases, tem uma projeção para a movimentação financeira de aproximadamente UR\$ 600 bilhões até 2020. Com destaque para a utilização dessas enzimas provenientes de origem microbiana ou animal, com aplicação em segmentos como alimentícios, produção de biocombustíveis e fornecimento de micro-organismos para uso agrícola, na saúde e nutrição de animais, limpeza industrial e no tratamento de efluentes e outros. Em 2017, a utilização de novos produtos pela indústria mundial, fez com que 76 milhões de toneladas de CO₂, fossem deixados de serem lançados na atmosfera. A nova meta para as empresas desse segmento será a redução de 100 milhões de toneladas de CO₂ até 2020 (MARKETS, 2017).

Enzimas microbianas hidrolíticas, como lipases e proteases correspondem a cerca de 40% das enzimas comercializadas em todo o mundo, representam os grupos enzimáticos de importância industrial (SILVA *et. al.*, 2016).

Em 1975, ocorreu no Brasil, na Cidade industrial de Araucária no Paraná, ocorreu à instalação da primeira e uma das principais indústrias enzimáticas do mundo a empresa dinamarquesa Novozymes, sendo responsável por 48% da produção global. Alguns anos depois deu início a produção industrial de enzimas e processos enzimáticos no país; com aplicações em alimentos, bebidas, detergentes, biocombustíveis, ração animal, enzimas técnicas e Biopharma. O mercado global de enzimas movimenta cerca de 20 bilhões de reais ao ano, e o mercado nacional atua com uma contribuição em torno de 6% dessa produção total. (DIA DE CAMPO, 2015).

No Brasil, as indústrias atendem a diversos perfis de clientes, para os mais variados produtos, distribuídos em: 41% para o mercado de detergentes, 26% de alimentos, 8% de rações e 25% de setores variados, incluindo o têxtil (tabela 2) (DIA DE CAMPO, 2015; MARKETS, 2017).

TABELA 2: Algumas aplicações industriais das enzimas.

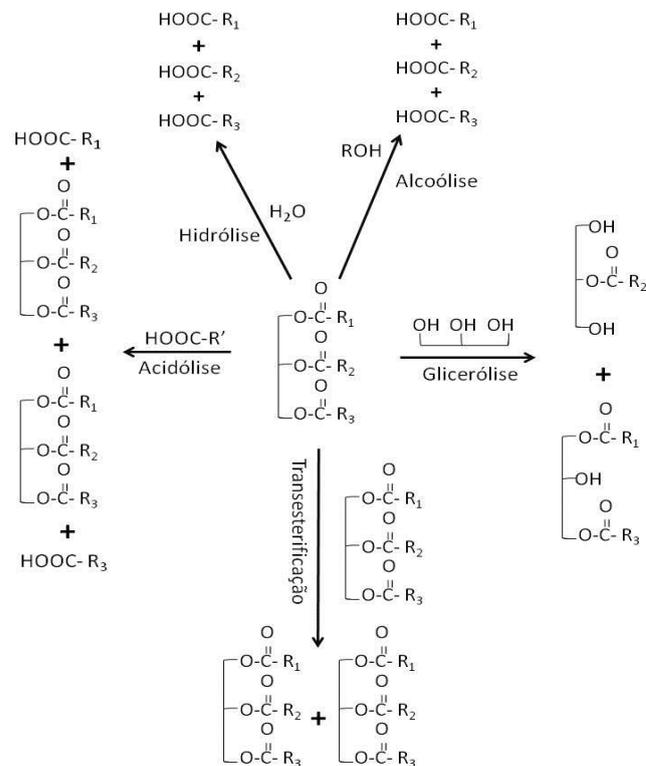
Aplicação	Enzimas	
Aplicação técnica	Polpa e indústria de papel	Amilase, lipase, celulose, β -xilanse
	Indústria têxtil	Amilase, celulase, pectinase, lactase
	Detergentes	Protease, lipase, amilase, celulase
Processamento de alimentos	Laticínios	Lipase, lisosima, β -galactosidase, lactose
	Panificação	α -amilase, β -xilanse, oxidoredutase, lipase, protease
	Sucos	Amilase, pectinase, celulase, lacase
	Indústria de cerveja	α -amilase, xilanase, protease, amiloglucosidase, β -galactosidase
Alimentos para animais	Xilanase, fitase, protease, α -amilase	
Síntese orgânica	Lipase, esterase, amilase, álcool desidrogenase	
Indústria de cosméticos	Oxidase, peroxidase, isomerase, transglutaminase, papaína	

Fonte: adaptado de Li *et. al.*, 2012.

2.4.4 Lipases

A principal função da lipase (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) é catalisar a hidrólise das cadeias longas de triacilglicerídeos. As lipases são produzidas por uma quantidade significativa de micro-organismos, que incluem fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Sendo as enzimas sintetizadas por fungos as mais utilizadas em processos industriais, devido à produção de lipases extracelulares, facilitando assim sua extração no meio fermentado (Figura.2) (MARTINS, et. al., 2008; PAPANIKOLAOU *et al.*; 2011).

FIGURA 2: Representação esquemática das reações catalisadas por lipases



FONTE: (Castro *et al.*; 2005)

As lipases são encontradas amplamente na natureza, podem ser de origem animal (lisossomos, estômago, tecido adiposo, vascular e linfático), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal (oleaginosas). As lipases microbianas podem ser usadas em uma vasta aplicação industrial devido a sua estabilidade em meio não-aquoso, versatilidade, menor custo de produção e velocidade de síntese. Podem ser intracelulares, mas em sua grande maioria são produtores de lipases extracelulares, fungos filamentosos e leveduras; isso permite um melhor

aproveitamento tanto para extração e isolamento, quando para a purificação dessas enzimas. (TABELA 3). (CARVALHO, 2003; CASTRO *et al.*, 2004; KAMUR *et al.*, 2005; HASAN *et al.*, 2006; MARTINS, 2008; CONTESINI *et al.*, 2010; TREICHEL *et al.*, 2010; GRIEBELER *et al.*, 2011; POPPE, 2012; RABBANI *et al.*, 2013).

TABELA 3. Aplicações industriais das lipases.

Indústria	Aplicação
Laticínio	Hidrólise de gordura do leite
Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração de processo fermentativo
Molhos e condimentos	Aumento de propriedades funcionais da gema do ovo
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução do conteúdo de gorduras
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos – introdução de ácidos graxos e hidrólise de óleos naturais
Química fina	Síntese de ésteres e resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Auxiliares da digestão
Médica	Determinação de lipídeos no sangue
Couro	Remoção de gorduras da matéria prima
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídios de efluentes

Fonte: Colla *et al.*; 2012

Micro-organismos produtores de lipases podem ser isolados de diferentes hábitat, como solo contaminado por óleo, efluentes industriais, ambientes com variações de temperatura (extremas) e salinidade (elevada) (HEMACHANDER *et al.*, 2001; HUN, *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; CASTRO-OCHOA *et al.*, 2005; FANG *et al.*, 2006).

A produção de lipase pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: o tipo de micro-organismo produtor das enzimas, as fontes de carbono e nitrogênio, a concentração de oxigênio dissolvido, composição, temperatura e pH do meio, tipo de aeração e agitação e modelo do biorreator (ELIBOL *et al.*, 2000).

As lipases tem aplicação em vários segmentos biotecnológicos, como em indústria alimentícia, de detergentes, na biotransformação de óleo e gorduras, produção de fármacos, tratamento de efluentes e biodegradação de polímeros produzidos por vários micro-organismos (Tabela 4) (MARTEN *et al.*, 2003; GALANTE, *et al.*, 2003; CARVALHO, *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2005; HANSA *et al.*, 2006; SANTOYO *et al.*, 2007; TARASSUK *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008).

TABELA 4: Micro-organismos produtores de lipases relatados na literatura (1965-2011)

Fonte	Microrganismos	Referências
Arqueobactérias	<i>Natronococcus</i> sp.	BOUTAIA <i>et al.</i> , 2006
Bactérias (Gram-positivas)	<i>Bacillus stearothermophilus</i> MC 7 <i>Bacillus megaterium</i> <i>Butkholderia glumae</i> <i>Butkholderia cepacia</i> <i>Ralstonia</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus xylosum</i>	KAMBOUROVA <i>ET. AL.</i> , 2003 LIMA <i>et al.</i> , 2004 KHATTABI <i>et al.</i> , 2003 FERNANDES <i>et al.</i> , 2007 YOO <i>et al.</i> , 2011 SHAH; WILSON, 1965 SIMONS <i>et al.</i> , 1998 MOSBAH <i>et al.</i> , 2007
Bactérias (Gram-negativas)	<i>Chromobacterium viscosum</i> <i>Photobacterium lipolyticum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> HU380 <i>Serratia marcescens</i>	JAEGER; REETZ, 1998 YANG; SOHN; KIM, 2009 JEAGER <i>et al.</i> , 1997 JEAGER; REETZ, 1998 KOJIMA; SHIMIZU, 2003 JEAGER <i>et al.</i> , 1997
Actinomicetos	<i>Streptomyces cinnamomeus</i> Tü89 <i>Streptomyces coelicolar</i> A3(2)	SOMMER; BORMANN; GÖTÉ, 1997 CÔTÉ; SHARECK, 2008
Leveduras	<i>Candida rugosa</i> <i>Candida cylindracea</i> <i>Torulopsis ernobii</i> <i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	DALMAU <i>et al.</i> , 2009 BROZZOLI <i>et al.</i> , 2009 YOSHIDA; MOTAI; ICHISHIMA, 1968 COSTA; DEIVE; LONGE, 2004 DOMÍNGUEZ <i>et al.</i> , 2003
Fungos filamentosos	<i>Antrodia cinnamomea</i> <i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus carneus</i> <i>Aspergillus terreus</i>	LIN; WANG; SUNG, 2006 TOM; CRISAN, 1975 SAXENA <i>et al.</i> , 2003

<i>Aspergillus niger</i>	GULATI et al., 1999
<i>Aspergillus oryzae</i>	EDWINOLIVER et al., 2010
<i>Beauveria bassiana</i>	TOIDA et al., 2000
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	HEGEDUS; KHACHATOURIANS,
<i>Botryosphaeria ribis</i>	1988
<i>Botrytis cinérea</i>	MESSIAS et al., 2009
<i>Cunninghamella verticillata</i>	MESSIAS et al., 2009
<i>Geotrichum</i> sp.	COMMÉNIL et al., 1999
<i>Fusarium globulosum</i>	GOPINATH et al., 2002
<i>Fusarium oxysporum</i>	BURKET et al., 2004
<i>Mucor circinelloides</i>	GULATI et al., 2005
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	PRAZERES; CRUZ; PASTARE, 2006
<i>Penicillium citrinum</i>	SZCZESNA-ANTCZAK et al., 2006
<i>Penicillium restrictum</i>	LIMA et al., 2003
<i>Penicillium simplicissimum</i>	MIRANDA et al., 1999
<i>Penicillium verrucosum</i>	CAMMAROTA; FREIRE, 2006
<i>Rhizomucor miehei</i>	GUTARRA et al., 2007
<i>Rhizopus arrhizus</i>	KEMPKA et al., 2008
<i>Rhizopus chunensis</i>	JEAGER; REETZ, 1998
<i>Rhizopus delemar</i>	LI; WANG; TAN, 2006
<i>Rhizopus homothallicus</i>	SUN; XU, 2009
<i>Rhizopus oryzae</i>	AÇIKEL, ERSAN, AÇIKEL, 2010
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	DIAZ et al., 2006
<i>Thichoderma viride</i>	ESSAMRI; DEYRIS; COMEAU, 1998
	FERNANDES et al., 2004
	KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006

Fonte: MESSIAS *et. al.*, 2011

A produção de lipase microbiana tem sido desenvolvida pela fermentação submersa (FSM) essas enzimas também podem ser produzidas através de processos fermentativos em estado sólido (FES) onde podem ser utilizados substratos insolúveis com baixas quantidades de água em sua composição, tais como os resíduos agroindustriais dentre eles: polpa de café, farelo de cereais, palhas de arroz e trigo, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (MARTINS *et al.*, 2008; MESSIAS *et al.*, 2011).

2.4.5 Micro-organismos oleaginosos

Alguns micro-organismos conhecidos na literatura possuem a capacidade de acumular óleo em suas estruturas internas com um elevado rendimento, espécies compreendidas em: microalgas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Com isso a utilização de micro-

organismos oleaginosos como fornecedores de óleo alternativo, vem se destacando devido à busca por novas fontes de matéria-prima para uso comercial viável na produção de biodiesel. Diferentes dos óleos extraídos de fontes vegetais, não necessitam de áreas cultivadas extensas e nem competem com os setores alimentícios (HAMA *et al.*; 2013).

Os fungos oleaginosos acumulam triglicerídeos ricos em ácidos graxos insaturados de longas cadeias carbônicas e lipídios exclusivos, como: ácido araquidônico, ácido eicosapentaenólico, ácido linoléico e ácido decosaheptaenólico. A biossíntese direta de ésteres refere-se ao Microdiesel (KALSCHEUER *et al.*, 2006; AZOCAR *et al.*, 2010).

Para serem considerados micro-organismos oleaginosos, eles devem acumular mais de 20% de lipídios em sua biomassa, podendo chegar a cerca de 70%, quando se encontram em períodos de estresse metabólico. Esses micro-organismos então envolvidos no Ciclo do Ácido Tricarboxílico ou Ciclo de Krebs, estando relacionados com a atividade da enzima isocitrato desidrogenase e à produção de ácido cítrico (RATLEDGE, 2004; LIU *et al.*, 2007; PAPANICOLAOU *et al.*, 2011; SOUZA, 2016).

Os fungos ditos como oleaginosos, possuem três fases de crescimento quando em condições de escassez nutricional: proliferação celular, acúmulo de lipídios e a fase estacionária, onde os lipídios armazenados são utilizados como fontes carbono pela célula (BEOPOULOS *et al.*, 2011; SOUZA, 2016).

2.5 PRODUÇÃO DE BIODIESEL

O biodiesel é um combustível biodegradável originado de fontes renováveis, que pode ser obtido através de diversos processos; sendo a transesterificação o mais usado para a produção, que consiste em um tipo de reação entre os lipídios com um álcool comum (etanol ou metanol), também podem ser obtidos através de craqueamento e esterificação; produzidos a partir de gorduras animais ou óleos vegetais. Segundo a lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, os biocombustíveis derivados da biomassa renovável para uso de motores a combustão interna ou ignição por compressão ou, conforme regulamento para a geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustível de origem fóssil (ZAWADKI, 2011; BRASIL, 2005; GAYLARD, 2005; BALAN, 2002).

O biodiesel produzido a base de esterificação de ácidos graxos, tem sido usado como uma alternativa para motores a diesel. A produção de biodiesel atinge cerca de 10% da

produção de biocombustíveis, produzidos com base em óleos comestíveis como soja, girassol e palma; com a crescente demanda de combustíveis no mundo, aumenta-se a busca por meio alternativos como resíduos e óleos não comestíveis como fonte de matéria-prima. (NOGUEIRA, 2011; BALAT, 2011).

O custo da matéria-prima indica o valor final para a viabilidade econômica do biodiesel, sendo assim o uso dos resíduos e óleos não comestíveis apresentam-se, nesse processo, como uma alternativa viável. Além dos óleos não comestíveis, também são usados: óleos de fritura, óleos comestíveis e microorganismos oleaginosos (HAMA *et al.*, 2013).

O método enzimático usando a lipase (E. C. 3.1.1.3) na transesterificação evita a formação de sabão, permitindo assim uma fácil recuperação do biodiesel e do glicerol, podendo ser operado em baixas temperaturas e pressão atmosférica, diminuindo o consumo de energia. Dada à abundância e o custo da matéria-prima dos óleos usados (LAM *et al.*, 2010).

Os resíduos de óleos de cozinha são gerados através dos óleos vegetais fritos em altas temperaturas, esse processo ocasiona alguns tipos de reações químicas, tais como hidrólise, oxidação e polimerização. Na Europa, América do Norte e Ásia a quantidade de óleo residual reaproveitado corresponde a 16,6 milhões de toneladas ao ano (AZÓCAR *et al.*, 2010).

3 METODOLOGIA

3.1 FUNGOS FILAMENTOSOS

As cepas fúngicas utilizadas foram cedidas de trabalhos executados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial do Departamento de Antibióticos da UFPE; isoladas de azulejos da Academia Pernambucana de Letras de Pernambuco (APL-PE) e de solo de Serra Talhada-PE do projeto da Rede Norte-Nordeste de Fungos Filamentosos da Caatinga e Amazônia (RENNORFUN) cedidos pela Coleção de Culturas UCP (UNICAP) e estão sendo depositadas na Micoteca URM (Tabela 5). As colônias puras foram mantidas em tubos de ensaio contendo o meio ágar Sabouraud a 4°C.

TABELA 5: Fungos filamentosos oriundos da solo da Caatinga e azulejos da Academia Pernambucana de Letras de Pernambuco.

Registro na URM	Nome	Origem
URM 7651	<i>Rhizopus arrhizus</i>	SOLO
URM 7652	<i>Rhizopus Microsporus</i>	SOLO
URM 7653	<i>Cunninghamella echinulata</i>	SOLO
URM 7654	<i>Rhizopus arrhizus</i>	SOLO
URM 7655	<i>Cunninghamella elegans</i>	SOLO
URM 7656	<i>Rhizopus microsporus</i>	SOLO
URM 7657	<i>Lichtheimia hyalospora</i>	SOLO
URM 7658	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	SOLO
URM 7659	<i>Mucor subtilissimus</i>	SOLO
URM 7660	<i>Cunninghamella echinulata</i>	SOLO
-	<i>Trichoderma hamantum</i>	AZULEJO
-	<i>Penicillium waksmanii</i>	AZULEJO

(-) Em processo de depósito na Micoteca URM

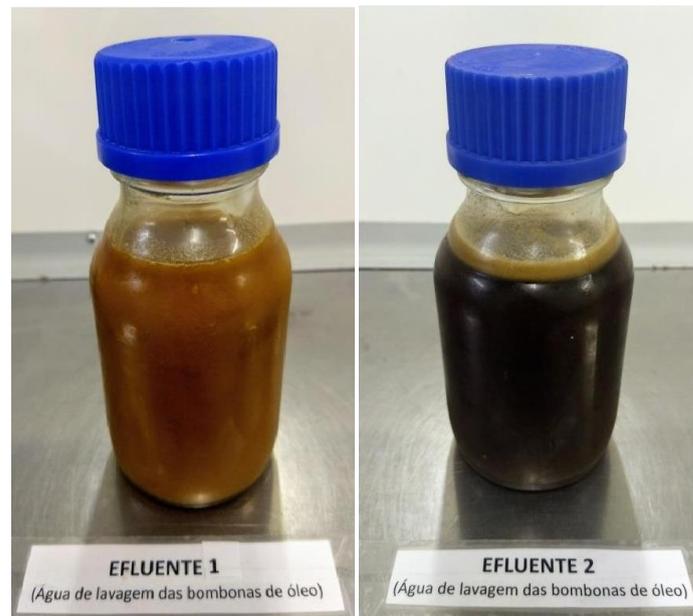
3.2 AMOSTRAS DE EFLUENTE

O efluente foi cedido pela empresa ASA Ind. e Com. - Fábrica Recife (R. da Paz, 82 - Afogados, Recife - PE, 50770-011). A empresa ASA recolhe em bombonas (50 litros) o óleo de fritura em residências, restaurantes, hospitais, hotéis e comunidade em geral para a produção de sabão. Entretanto, para a lavagem dos recipientes de coleta do óleo a empresa ASA tem tido problemas na descontaminação do efluente, pois a água ainda contém um percentual elevado de óleo e não podem ser descartados nos corpos hídricos. A empresa ASA

está procurando minimizar os problema na estação de tratamento de efluente e o alto custo de tratamento químico.

O efluente foi caracterizado em relação à DBO, DQO, nitrito, nitrato, fosfato, condutibilidade e sólidos totais foram realizados na Universidade CEUMA-MA.

FIGURA 3: Efluentes industriais oleosos, provenientes da lavagem de bombonas com óleo de fritura.



3.3 SELEÇÃO DE LINHAGENS

Os fungos filamentosos foram selecionados pela capacidade de crescimento em meio alternativo usando como substrato concentrações do efluente da lavagem de bombonas contendo óleo de fritura e pela produção de lipase.

Cada micro-organismo foi submetido a três concentrações diferentes (1, 3, e 5% v/v) para os dois tipos de efluentes (efluente 1 – água proveniente do processo de filtração do óleo de fritura, possuindo água mais emulsão; efluente 2 – água proveniente da lavagem da bombonas, após a retirada do óleo e das impurezas, com aproximadamente 3% de gordura), o crescimento foi realizado em frasco de Erlenmeyer (250 ml) com 50 ml de meio BH (pH 7,0). Os fungos foram mantidos na condição estática a temperatura de 30°C durante 144 horas. Após esse período o material foi filtrado com papel de filtro quantitativo, a biomassa foi lavada com detergente (comercial) e água destilada para remoção das partículas de óleo no

micélio fúngico, tanto a biomassa quanto ao sobrenadante obtidos foi mantido sob refrigeração a 5°C, para análises posteriores.

3.4 ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para a detecção da lipase foi utilizado o método descrito por Winkler e Stukmann (1979) e modificado por Lima et. al. (2004). Baseia-se na hidrólise do palmitato de p-nitrofenila pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica (Sigma) e o Triton X-100 (Sigma). A liberação do p-nitrofenol, de coloração amarela e em seguida realizada a leitura em espectrofotômetro a 410 nm. O ensaio foi realizado com a mistura de 1 mL da solução de palmitato de p-nitrofenila (Sigma) em isopropanol, em uma concentração de 3 mg.mL⁻¹, com 9 mL da solução de 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹ (pH 7,0). Para o cálculo da atividade foi utilizada a equação (abaixo), e a unidade de atividade enzimática (U) definida como a liberação de 1 µmol de pNP (p-nitrofenol) por minuto (equação 1).

EQUAÇÃO 1: Cálculo da atividade lipolítica.

$$A = \frac{C_{ang} \cdot 60 \cdot ND}{\varepsilon \cdot X_{enz}}$$

Sendo:

C_{ang} : coeficiente angular obtido da cinética de reação (absorbância x tempo em segundos);

60: transformação de segundos para minuto;

ND: número de diluições;

ε : coeficiente de extinção molar do pNPP a pH 7,0;

X_{enz} : volume (em mL) ou massa da enzima imobilizada (mg).

O coeficiente de extinção molar do pNPP, em pH 7,0, (9,78.103 L.mol⁻¹.cm⁻¹) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura.

O método de Bradford (1976) é um ensaio colorimétrico para a determinação de proteínas totais, com a utilização do corante “Coomassie brilliant blue” BG-250. Essa técnica é baseada na interação do BG-250 com as macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias aromáticas ou laterais básicas. No pH da reação, ocorre a interação entre o corante e a proteína com alto peso molecular, que causa um equilíbrio no corante para a forma aniônica, que absorve em 595nm (ZAIA, *et al.*; 1998; COMPTON, *et al.*, 1985).

Para a determinação de proteínas totais (equação 2) e atividade específica lipolítica (equação 3), foram usadas às equações descritas a baixo:

EQUAÇÃO 2: Cálculo da determinação das proteínas totais.

$$\mu\text{g/ml} = \frac{\text{Absorb.} - 0,0013 \times 7}{0,0122}$$

EQUAÇÃO 2: Cálculo da atividade específica da lipase

$$U/\mu\text{g} = \frac{X}{Y}$$

Sendo: X – lipase (U); Y- proteína (U/ μg)

3.5 TRATAMENTO DO EFLUENTE UTILIZANDO BIORREADORES

O fungo filamentososo que apresentou a maior atividade específica foi escolhido para esse experimento. Para esse teste foram utilizados 5 aquários (6.000 ml) como modelo de biorreator .

Nesse ensaio foi utilizado meio sintético mineral Busshell Hass (BH), com alimentação em batelada simples contendo 5% do efluente e o pH foi ajustado para 7,0. O volume final utilizado no biorreator foi de 2.000mL, permanecendo de modo estático a temperatura $\pm 30^\circ \text{C}$ ($\pm 2^\circ$) durante 7 dias, simulando as possíveis variações das condições de uma estação de tratamento convencional. Nesse ensaio foram utilizados 5 biorreatores: A) contendo Meio BH + micro-organismos + 5% efluente; B) contendo Meio BH + micro-organismos + 5% glicose; C) contendo Meio BH + 5% efluente; D) contendo Meio BH + micro-organismos + 5% efluente + 5% glicose; E) contendo Meio BH + 5% efluente + 5% glicose. Nos biorreatores que continham o fungo filamentososo foram colocados 400 blocos de gelose ($\varnothing 9\text{mm}$).

Após 7 dias, foi realizada a filtração a vácuo com o auxílio de papel filtro qualitativo 185 mm.

A determinação do DQO e DBO foi realizada no Laboratório de Engenharia Ambiental e Qualidade (LEAQ) e para o cálculo da relação entre DQO/DBO₅ na Relação adimensional para identificar se é possível fazer o tratamento biológico do efluente (equação 3) e da eficiência de remoção (equação 4) foram utilizadas as equações abaixo:

$$R = \frac{DQO}{DBO}$$

EQUAÇÃO 3: R- Relação adimensional; DQO- Efluente bruto (ou tratado); DBO- Efluente bruto (ou tratado)

$$E = \frac{C_o - C_f}{C_o} \times 100$$

EQUAÇÃO 4: Eficiência de remoção; E- eficiência de remoção (%); Co- Efluente bruto mg/l (inicial); Cf- Efluente bruto mg/l (final)

3.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS TOTAIS

Os lipídios foram extraídos de acordo com o método escrito por Manocha et. al. (1980). Da biomassa liofilizada foram utilizados 1,0g e realizada extrações sucessivas com clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). O material foi submetido à agitação por 15 minutos e em seguida mantido a temperatura de 5°C. O sobrenadante foi separado da biomassa por centrifugação a 5.000g, por 10 minutos e a biomassa submetida a uma nova extração. Os sobrenadantes contendo os extratos foram reunidos e concentrados em rota-evaporador. As respostas para a produção de lipídios foram calculadas em termo de concentração de lipídios ($g L^{-1}$) ou lipídios totais (%) de acordo com o Rendimento percentual de lipídios totais, equação 4:

$$\text{Lipídios totais (\%)} = \frac{\text{Massa de lipídios}}{\text{Biomassa seca (g)}} \times 100$$

3.7 METILAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS:

A caracterização dos ácidos graxos foi baseada na metodologia de Durban e Kloos (1978). Para a extração, 10mg de biomassa seca foram transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca, solubilizado em 3ml da solução trifluoreto-boro com 14% de metano e 3ml de hexano, sendo este último removido e concentrado em atmosfera de nitrogênio. Os ácidos graxos convertidos em ésteres de metil foram solubilizados em n-hexano. Para detecção dos ácidos graxos foi utilizado o cromatógrafo modelo CGMS, Shimadzu GP 5050A, equipado com detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5% de difenil e

95% de dimetilpolisiloxano), 30m x 0,25mm, com diâmetro interno de 0,25 μ m. A temperatura do forno da coluna terá a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial de 150°C por 5 minutos, aumentando até 240°C com taxa de 4° por min. Temperatura final de 250°C por 15min, aumentando com taxa de 5° por min. A temperatura do detector e do injetor será de 250°C, usando o Hélio (1cm³min⁻¹) como o gás de arraste. Espectrômetro de massas com intervalo de varredura de 40m/z até 450m/z, com velocidade de scan de 1000; tempo de análise é de 52.50min. Os ésteres metílicos serão identificados pela comparação a ajuda da Biblioteca de Compostos NIST11.

3.8 AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE

Para a avaliação de efeitos de fitotoxicidade do material residual foram utilizadas sementes de *Cucumis sativus* (pepino) modificando o teste descrito por Tiquia *et. al.*, (1996). Após a desinfestação, dez sementes foram colocadas equidistantes em placas de Petri com papel filtro duplo, nas quais foram embebidos com 2ml de material residual do teste em biorreatores. Os experimentos foram realizados em triplicata e com controles; um com água destilada como controle positivo e o outro apenas com o efluente como negativo. Após o período de incubação (\pm 30°C por 5 dias) foi realizada a medição das raízes calculadas com o auxílio de um paquímetro e calculado o percentagem de germinação, crescimento das raízes e o índice de germinação.

O Índice de Germinação (IG) (equação 7) é calculado combinando o Percentual de Germinação (%G) (equação 5) e o Percentual de Crescimento das Raízes (%CR) (equação 6): os cálculos foram realizados de acordo com as seguintes equações:

EQUAÇÃO 5: Percentual de Germinação (%G)

$$\%G = \frac{\text{média de sementes testes germinadas}}{\text{média de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

EQUAÇÃO 6: Percentual de Crescimento das Raízes (%CR)

$$\%CR = \frac{\text{média de crescimento da raiz}}{\text{média de crescimento da raiz no controle}} \times 100$$

EQUAÇÃO 7: Índice de germinação (IG)

$$IG = \frac{(\% \text{ Germinação das Sementes}) \times (\text{Crescimento das raízes})}{100\%}$$

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE BRUTO

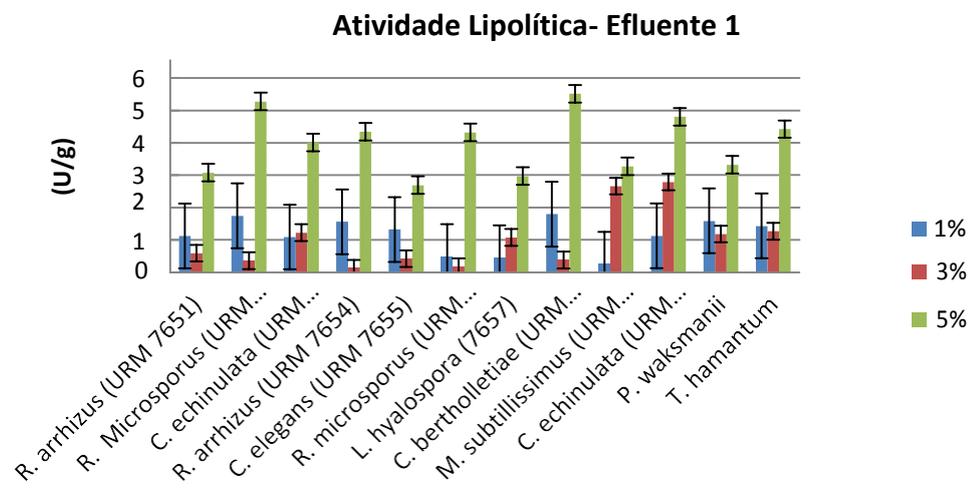
No efluente oleoso 2, foram obtidos os seguintes valores de: DQO 216,2 mg/L, DBO 145,78 mg/L, nitrito 0,870 g, nitrato 0,047g, fosfato 0,654g, condutibilidade 601 μ S/cm e sólidos totais 301 mg/L.

Para o efluente 1 não foi possível caracterização de DBO, DQO, nitrito, nitrato, fosfato, condutibilidade e sólidos totais por apresentarem impurezas. Nesse caso, para cálculo da eficiência de remoção do DQO e do QBO, foram usados os parâmetros obtidos no efluente oleoso 2, com o fator de diluição multiplicado por 1.000. Assim, obtivemos DQO 216.200 mg/L e DBO 145.780 mg/L.

4.2 SELEÇÃO DAS LINHAGENS

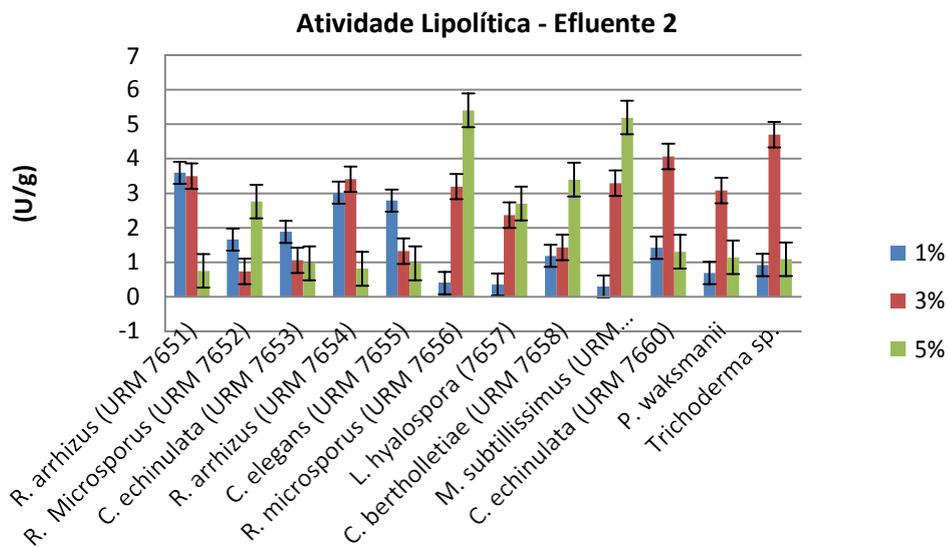
Verificou-se que a maior produção de lipases ocorreu na fermentação com 5% de concentração no Efluente oleoso 1. O efluente selecionado exerce efeito significativamente positivo para o crescimento microbiano, entre as cepas que se destacaram na atividade lipolítica estão os microorganismos em destaques estão *R. microsporus* URM 7652, *R. arrhizus* URM 7654, *R. microsporus* URM 7656, *C. bertholletiae* URM 7658, *C. echinulata* URM 7660 e *T. hamantum*.

FIGURA 4: Atividade lipolítica nas concentrações de 1, 3, e 5% do efluente 1.



Na figura 6, então representados os valores correspondentes a atividade lipolítica contendo como o meio indutor o efluente oleoso 2, onde os micro-organismos em destaques estão *R. microsporus* URM 7656, *C. echinulata* URM 7660, *T. hamantum* e *M. substillissimus* URM 7659.

FIGURA 5: Atividade lipolítica nas concentrações de 1, 3, e 5% do efluente 2.



4.3 BIORREATORES

A *Cunninghamella bertolletiae* (URM 7658) foi selecionado devido à atividade enzimática 5,514 U/g, na qual foi superior aos outros fungos testados.

Com o tratamento enzimático observou-se que os resultados estavam à cima de 90% da remoção do DBO e DQO, atendendo assim as exigências estabelecidas pelo CONAMA com a resolução 430/11; a legislação determina como valor mínimo na remoção do DBO de 60%. (CONAMA, 2011)

No ensaio com os biorreatores os valores de pH após 7 dias foi de Os fungos crescem em uma ampla faixa de pH, sendo o ideal ácido entre 4,0 e 6,0 e para fungos filamentosos os podem variar entre 2,0 e 9,0 com o pH ótimo estando em 5,6; com os resultados obtidos observou-se que os meios glicosados diminuiram o pH para em média 5,5; estando o meio inicial ajustado para pH 7,0. O pH do meio enriquecido com glicose diminuiu devido ao consumo do carbono, gerando metabólitos ácidos excretados no meio e sínteses metabólicas, como é o caso das enzimas lipolíticas (TABELA 6).

TABELA 6: Ensaio dos biorreatores com *Cunninghamella bertholletiae*

Amostras	pH	DQO	DBO	RA
A	5,5	46.801	12.009	3,89
B	7	6.408	1.148	5,58
C	6	2.978	312	0,009
D	5,5	48.754	14.512	3,35
E	5	49.011	13.939	3,51

Legenda: A) contendo Meio BH + CB + 5% efluente; B) contendo Meio BH + CB + 5% glicose; C) contendo Meio BH + 5% efluente; D) contendo Meio BH + CB + 5% efluente + 5% glicose; E) contendo Meio BH + 5% efluente + 5% glicose. CB - *Cunninghamella bertholletiae*; RA- Relação Adimensional

Para a atividade lipolítica estão listadas na tabela 7, a utilização da *C. bertholletiae* no tratamento em biorreator com o efluente 1 a 5% e combinações alternadas de 5% de glicose para testar o comportamento do fungo em relação a carga nutricional.

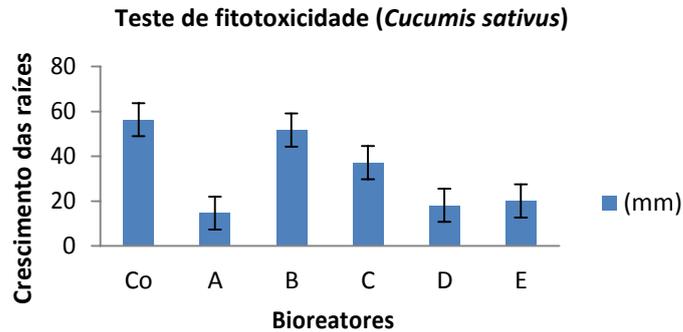
TABELA 7: Produção de atividade lipolítica pela *Cunninghamella bertholletiae* em biorreator com diferentes composições de substratos.

Biorreator	Atividade específica
A	1,242 Ug
B	1,044 U/g
C	0,776 U/g
D	0,531 U/g
E	0,636 U/g

Legenda: 1) contendo Meio BH + CB + 5% efluente; 2) contendo Meio BH + CB + 5% glicose; 3) contendo Meio BH + 5% efluente; 4) contendo Meio BH + CB + 5% efluente + 5% glicose; 5) contendo Meio BH + 5% efluente + 5% glicose. CB - *Cunninghamella bertholletiae*

4.4 TESTE DE FITOTOXICIDADE

No teste de fitotoxicidade os meios glicosados apresentaram crescimento deficiente das sementes, possivelmente causado por metabólicos secundários tóxicos liberados pelo micro-organismo no processo de fermentação. Com isso, em comparação ao controle abiótico (Co), composto por água destilada e as sementes, é possível observar que o biorreator B foi o mais favorável para a germinação das sementes, sendo assim, demonstrando eficiência no tratamento sem a adição de cofatores.

FIGURA 6: Média do crescimento das raízes de *Cucumis sativus*TABELA 8: teste de fitotoxicidade com sementes de *Cucumis sativus* e o líquido metabólico dos biorreatores.

Biorreator	%G	%CR	%IG
A	92,85	25,95	24,09
B	100	91,77	91,77
C	90,47	66,05	59,75
D	85,71	32,15	27,55
E	100	35,68	35,68

Legenda: %G (Percentual de Germinação), %CR (Percentual de Crescimento das Raízes) e IG (Índice de Germinação).

4.5 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS

A extração de lipídios totais foi realizada apenas para os micro-organismos crescidos no meio contendo o efluente 1, pois obtiveram a quantidade mínima de biomassa necessária para a realização do teste, que corresponde a 1,0g de biomassa liofilizada. O micro-organismo quando em colocado em situação de estresse metabólico, pode acumular até 70% de lipídios em sua biomassa e a *C. bertholletiae* obteve valores máximos na produção de até 64%.

TABELA 9: Resultado da extração de lipídios totais, de micro-organismos crescidos no meio contendo o efluente 1, de acordo com o método descrito por Manocha *et al.*, 1980.

Micro-organismo	Concentrações do efluente 1		
	1%	3%	5%
<i>C. bertholletiae</i> URM 7658	64,13	46,99	50,60
<i>R. microsporus</i> URM 7656	41,37	22,86	20,07
<i>C. echinulata</i> URM 7660	-	-	46,58
<i>C. elegans</i> URM 7655	7,99	30,06	28,85
<i>R. arrhizus</i> URM 7651	42,19	9,91	-
<i>C. echinulata</i> URM 7653	22,46	12,03	32,06
<i>R. arrhizus</i> URM 7654	11,01	15,56	-

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

Na tabela 11, temos resultado da cromatográfica realizado com a *Cunninghamella bertholletiae* com os tipos de ácidos graxos presentes nos extratos, em diferentes concentrações e possíveis aplicações industriais.

TABELA 10: Quantificação dos ácidos graxos da biomassa fúngica

Ácido Graxo	Concentrações do efluente 1			Concentrações do efluente 2		
	1%	3%	5%	1%	3%	5%
AC PALMITICO	28,14	30,40	26,52	*	38,07	35,42
AC LINOLEICO	14,29	11,60	-	*	-	6,33
AC OLEICO	39,77	-	-	*	-	45,85
AC PETROSELINICO	11,29	14,43	-	*	-	-
AC ESTEARICO	6,52	7,78	6,78	*	-	10,21
AC OCTADECENOICO	-	34,80	8,20	*	48,98	-
AC HEXADECENOICO	-	-	0,79	*	-	-
AC OCTADIENOICO	-	-	56,35	*	12,95	-
AC GAMA LINOLENICO	-	-	0,57	*	-	2,20
AC EICOSANOICO	-	-	0,27	*	-	-
AC METIL NONADECANOATO	-	-	0,33	*	-	-
AC BEHENICO	-	-	0,19	*	-	-

(-) Ausência do ácido graxo na amostra;

(*) Não apresentou produção significativa para liofilização da biomassa, por tanto a quantificação dos ácidos graxos não foi realizada.

5 DISCUSSÃO

SELEÇÃO DAS LINHAGENS

A *Cunninghamella bertholletiae* (URM 7658) foi a melhor cepa testada com atividade lipolítica de 0,055 U/g, podendo ser comparados com os valores obtidos em trabalhos com avaliação de produção lipolítica de 52 cepas de fungos filamentosos (ainda não identificados) isoladas do Cerrado do estado de Tocantins, com atividade enzimática variando entre 0,072 e 0,053 U/g (SOARES, *et. al.*, 2015)

Sales, *et. al.*, 2017, em seus experimentos com *Cunninghamella echinulata* obtiveram uma produção de 5,84 U/ml de lipase, com meio enriquecido com azeite de oliva em fermentação submersa que corroboram com os resultados obtidos nesse estudo.

BIORREATORES

Segundo Brigda *et. al.*; (2014), as quantidade de oxigênio dissolvido no meio, temperatura, pH e fontes como nitrogênio e carbono, são fatores determinantes na produção de lipase.

Sexana, *et. al.*, (1999) observou em seus trabalhos com atividade lipolítica fúngica a alteração do pH de neutro para ácido com espécies de *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus*, assim como foi observado nos biorreatores glicosados no presente estudo.

A alteração do pH do meio de cultura passando do neutro para ácido não prejudicou a produção enzimática. O crescimento microbiano e a produção de enzimas lipolíticas não possuem fatores dependentes e a produção enzimática foi mais expressiva na fase estacionária do crescimento (FURINI, 2017; MOUBASHER et al, 2016; ALMEIDA, 2014; NASCIMENTO & MARTINS, 2006).

Assim como no presente estudo, a *Cunninghamella* sp., demonstrou ser um micro-organismo de fácil manuseio, se adapta a substratos alternativos como resíduos agroindustriais e efluentes líquidos, possuem uma capacidade catalítica satisfatória, produzem quantidades significativas de lipase, por isso, são economicamente viáveis para a indústria (SALES, *et al.*, 2017).

Para a eficiência do tratamento biológico, o biorreator B (contendo o efluente oleoso 1 e a *C. bertholletiae*), obteve valor satisfatório, segundo os parâmetros estabelecidos por Von Sperling (2005), pois os resultados da relação adimensional próximos de 5 indica a eficiência

do tratamento biológico. Já para os abaixo valores inferiores a 2,5 possuem um índice de biodegradabilidade considerado elevado e a tendência é essa relação aumentar após o início do tratamento, ocasionada pela redução da matéria biodegradável presente no efluente.

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

A qualidade do biodiesel depende da composição dos ácidos graxos e da matéria-prima usada, conseqüentemente não são todos os micro-organismos que possuem condições de atuar na produção do biocombustível. Não há um único ácido graxo, responsável pela qualidade do biodiesel, mas ácidos graxos saturados em excesso prejudicam a qualidade da ignição devido ao congelamento do produto, tendo como principal motivo o ponto de fusão, provocando o entupimento prejudicando o funcionamento do motor. Para os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, o ponto de fusão do ácido linoléico corresponde a -5°C e ácido oléico é de 4°C, dificultando o congelamento do biodiesel, sendo assim, a maior quantidade desses componentes são essenciais para a qualidade do biocombustível (KNOTHE, et al., 2008; VICENTE, et al., 2010; ISLAM, et al., 2013; SOUZA, et al.; 2016).

Corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, SOUZA et al.; (2016), em seus estudos com efluentes oleosos e resíduos agro industriais, obtidos através da biomassa da *Candida lipolytica*, um perfil de estéreis de ácidos graxos, próximos a os valores encontrados no óleo de soja sendo o oléico 41,4%, Ácido palmítico 27,4% e o linoléico 18,4% .

Papanikolaou et al., (2009) em seus experimentos com *Candida lipolytica*, obtiveram uma perfil de ácidos graxos em torno de 47% de ácido oléico, 21% de ácido linoléico, 15% de ácido palmítico e 11% de ácido esteárico, os valores dos ácidos insaturados são inferiores aos do presente estudo.

Em comparação ao biodiesel produzido com base do óleo de soja o de origem fúngica apresenta vantagens como não necessita de áreas cultivadas e nem competem com a industrial alimentícia, sendo esse a principal fonte de matéria-prima para a produção do biocombustível no Brasil, Estados Unidos e na Europa; apresenta um perfil de aproximadamente 54% de ácido linoléico, 22% de oleico e os demais saturados. A predominância desse tipo de ácido graxo do tipo poli-insaturado faz com que sejam necessárias medidas como o aumento do iodo no biodiesel e acidez do biocombustível (VICENTE, et al., 2010).

TESTE DE FITOTOXICIDADE

Alguns autores descrevem valores limites como parâmetros em relação à toxicidade no Índice de Germinação em relação ao composto do efluente tratado; valores a baixo de 50% são considerados tóxicos, entre 50 e 80% são considerados moderadamente tóxicos e os valores a cima de 80% são considerados não tóxicos (ZUCCONI *et. al.*,1986; TIQUIA, *et. al.*,1996).

A *C. bertholletiae* destacou-se entre as espécies testadas como a maior produtora lipolítica, sendo usada para o tratamento enzimático em biorreatores observou-se que os resultados estavam acima de 85% para DBO e 77% para DQO, com 90% para o Índice de Germinação no teste de fitotoxicidade, considerado não tóxico.

6 CONCLUSÃO

No teste de antagonismo microbiano que possuiu caráter qualitativo, as cepas fúngicas testadas pertencentes à ordem Mucorales (*Rhizopus* sp., *Cunninghamella* sp., *Mucor* sp. e *Lichtheimia* sp.) e as espécies pertencentes aos gêneros *Penicillium* sp., e *Trichoderma* sp.; não apresentaram halo significativo sendo considerado negativo para todas as 12 espécies testadas, significando que podem atuar em tanto isoladas, quando em consórcios.

Devido a sua composição química e por apresentar potencial para produção de biomassa e metabólicos microbianos, para a produção de lipase por biorreatores o efluente 1 foi usado nesse trabalho como principal componente do meio de cultivo.

A relação entre DQO/DBO₅, apresenta um índice de degradabilidade satisfatório após o tratamento biológico.

A produção de lipase por fungos filamentosos, atuando como biorremediadores de ambientes contaminados com o efluente de lavagem do óleo de fritura; e ao final do processo obter um subproduto menos tóxico, que atende as normas exigidas pela legislação ambiental.

O biodiesel para ser considerado de qualidade, depende diretamente tipo matéria-prima e da composição dos ácidos graxos; não são todos os micro-organismos que podem atuar nesse ramo industrial dos biocombustíveis, devido a presença ou ausência de determinado componente, ocasionando assim, em outro tipo de aproveitamento industrial.

REFERÊNCIAS

- ALBERTON, D.; MITCHELL, D. A.; CORDOVA, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. *Food Technol. Biotechnol.*, v. 48, n.1, p. 28-35, 2010.
- ALMEIDA, E. J.M. GROSSI, L. J. (2014). Estudo do processo de tratamento de água da indústria de laticínio. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Alenas – UNIFAL, 30p
- AMARA, A.A.; SALEM, S.R.; SHABEB, M.S.A. (2009). The Possibility to Use Bacterial Protease and Lipase as Biodetergent. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, v. 4, n. 2, p. 104-114.
- AZOCAR, L; CIUDAD, G; HEIPIEPER, H. J. NAVIA, R (2010). Processos biotecnológicos para a produção de biodiesel utilizando óleos alternativos. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 88, 621-636
- BALAN, R.; FLINN, J.; SATYANNARAYANAN, M. (2002). The case for cyber foraging. In: Proceedings of the 10th workshop on ACM SIGOPS European workshop. ACM. P. 87-92
- BALAT, M. (2009). Potenciais alternativos para óleos comestíveis para a produção de biodiesel. A revisão do trabalho atual. *Convers de energia. Gerir.* 52, 1479-1492. Balcão, VM, Paiva AL, Malcata, FX, 1996.
- BARANA, A. C.; LIMA, R. C.; BOTELHO, V. B.; SIMÕES, D. R. (2012). Desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada feita com soro ácido de queijo quark. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 7, n. 5, p. 13–21.
- BELO, M. O. M; 2009. Degradação hidrolítica dos concentrados obtidos pelo processo de flotação de efluente da indústria láctea. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Universidade Católica de 91, Pernambuco – UNICAP, 68p.
- BRADFORD, M. M. (1976). Um método rápido e sensível para a quantificação de micrograma de proteína utilizando o princípio da ligação proteína-corante. *Bioquímica analítica. anal.biochem*, 72, 248
- BRASIL. Lei nº 12.305, de 13 de janeiro de 2005. Introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera a Lei no 9.478, de 06 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro

de 1999 e 10.636 de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Data da legislação: 14/janeiro/2005 – Publicação DOU 14/janeiro/2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm. (Acesso em: 17. nov. 2018).

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Data da legislação: 02/08/2010 – Publicação DOU, de 03/08/2010. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm. Acesso em: 01 out. 2017.

BRIGIDA, A. I. S.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z.; GONÇALVES, L. R. B. (2014). Lipase da *Yarrowia lipolytica*: Produção, caracterização e aplicação como biocatalizador industrial. *Jornal de catálise Molecular B: Enzymatic* 101, 148-158

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

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B. NOFFS M. D. A. OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. (2003). Aplicações de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos grãos poli-insaturados. *Química Nova*, vol. 26, n.1, p. 75-80

CARVALHO, L.F.F.; P.R.M.B, JUNIOR, M.S.S., CASTIGLIONI, G.L. (2015). Aplicação de lipase microbiana no tratamento de resíduos oleosos. *Blucher Chemical Engineering Proceeding*, v.1, n 2, p. 2354-2361

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. SANTOS J. C.; AGUIAR, C. L. (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 1678-7064

CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRIGUEZ-GÓMES, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. (2005). Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme microb Technol*, v. 37, p. 648-654

CHAMPE, P. C.; HARDEY, R. A. (1996). *Bioquímica ilustrada*. Ed. Artemed. 2º edição, Porto Alegre.

- CHEN, Y. XIAO, B.; FU, Y.; LV, P. & WANG, X. (2016). Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Waste Managent*. 58: 376-385.
- CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. (2014). Enzymatic biodiesel challenges and opportunities. *Applied Energy*, v. 119, p. 497-520
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. (2012). Aplicações e produção de lipases microbianas. *Revista CIATEC-UPF*, v. 4, n. 2, p. 1-14
- COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; (1985) satellite remote sensing of total herbaceous biomass production in the Senegalese Sahal: 1980-1984, *Remote sensing of environment*, v.17, n.3, 233-249
- CONAMA, , (2011). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, alterada pela Resolução 410/2009 e pela Resolução 430/2011. Diário Oficial da União, p. 8
- CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P. O. , (2010). *Aspergillus sp.* Lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic*, v. 67, n. 3-4, p. 163-171
- DE JESUS, S.S.; SANTANA, A.; PONCE, G.H.S.F. & MACIEL FILHO, R. (2017). Potential use of vegetable waste for biofuel production. *J.ChemTechnolBiotechnol*; 92: 90–99.
- DIA DE CAMPO, (2015). Mercado global de enzimas movimentada US\$3,74 bilhões até 2015. *Jornal Dia de Campo*, 2016. Disponível em: www.diadecampo.com.br. Acesso em: 19 de julho de 2018
- DUFRECHE, S.; HERNANDEZ, R.; FRENCH, T.; SPARKS, D.; ZAPPI, M.; Alley, E. (2007). Extraction of lipids from municipal wastewater plant microorganisms for production of biodiesel. *Journal American Oil Chemistry Society*, 84, 181
- DURHAM , D. R & KLOOS , W. E. (1978). Comparative Study of the Total Cellular Fatty Acids of Staphylococcus Species of Human Origin. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28(2): 223-228
- ELIBOL, M.; OZER, D.; (2000). Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*., 36, 325, p.325-329

- FANG, Y.; LU, Z.; BIE, X.; LIU, S.; DING, Z. (2006). A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. *Cur Microbiol* v. 53, p. 510-515
- FURINI, G. 2017. produção de enzimas lipolíticas por bactérias isoladas em sistemas de tratamento biológico de efluentes. Dissertação (MESTRADO em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre – RS
- GALANTE, Y. M.; FORMANTICI, C. (2003). Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Current organic Chemistry*. 7,1399
- GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. (2005). Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v 8, n. 34, jan/jun..
- GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; FRANCIELI, A.; REMONATTO, D.; VANDDANEGA, R.; CECHET, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW. J. L. (2011). Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*, v. 4, n. 4, p. 578-586
- HAMA, S.; KONDO, A. (2013). Enzymatic biodiesel production : an overview of potential feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 386-395
- HAMA, S.; KONDO, A. , (2013). Produção de biodiesel enzimático: uma visão geral de matérias-primas potenciais e desenvolvimento de processos. *Tecnologia Bioresource*, Elsevier. 135, 386-395
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, (2006). A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and microbial technology*, v.39, p.235-251
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 782
- HEMACHANDER, C.; BOSE, N.; PUVANAKRISHNAN, R., (2011). Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochem* v. 36, p. 629-633

HOORNWEG, D. & BHADA-TATA, P. (2012). *What a Waste: A Global Review of Solid Waste Management. Urban Development Series Knowledge Papers*, N 15

HUN, C. J.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BARSİ, M. A., (2003). Newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochem Eng J.* v. 15, p. 147-151

IBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology. *Recommendations on Biochemical & organic nomenclature, symbols & terminology etc.* Disponível em: <www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>. Acesso em: 10.ago.2018

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OSAKI, A. (1971). Improvement of Kasugamicin-producing strain by the agar piece method and phototroph method. *Folia Microbiologica* 16: 218-224.

ISLAM, Muhammad Aminul et al. (2013). Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. *Procedia Engineering*, v. 56, p. 591-596

JAISWAT, A.; PREET, M.; TRIPTI, B. Production and Optimization of Lipase Enzyme from Mesophiles and Thermophiles (2017). *J. Microb. Biochem. Technol.* , 9:3, 126 -131

KALSCHEUER, R., STOLTING, T., STEINBUHEL, A., (2006). Microdiesel: *Escherichia coli*, Engenharia para a produção de biodiesel. *Microbiology* 152, 2529-2536

KAMUR, S.; SINGHT, D.; SANGWAN, P.; GILL, P. K. (2014). Global Market Scenario of Industrial Enzymes. *Industrial Enzymes*. 987-1-63321-338-8

KNOTHE, G.; (2008). “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties†. *Energy & Fuels*, v. 22, n. 2, p. 1358-1364

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. K.; GUPTA, R., (2005). Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr Purif.* v. 41, p. 38-44

KÜSTER, E. (1959). outline of a comparative study criteria used in characterization of the Actinomycetes. *International Bulletin of Bacteriology*, v.9, o.98-104.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMAD, A. R.; (2010). Homogêneo, heterogêneo e catálise enzimática para transesterificação de óleos e ácidos graxos livre elevados para biodiesel (óleo residual de cozinha): uma revisão. *Biotechnol. Adv.* 28, 500-518

LI, C. Y.; CHEN, S. J.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. (2005). Production of *Actinobacter radioresistens* lipase with repeated fed- bad-batch culture. *Biochem Eng J.* v. 25, p. 195-199

LI, S, YANG, X.; YANNG, S.; ZHU, M.; WANG, X., (2012). Thechnology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engeneering. *Computational and Strutural Biotechnology Journal.* E201209017

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D., (2004). Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, v. 18, p. 65-71

LIU, B.; ZHAO, Z. K. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, n. 8, p. 775-780

MANOCHA, M. S., SAN-BLAS, G., CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *Microbiology*, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980

MARKETS AND MARKETS, Novozymes. Annual Report, (2015). Disponível em: <report2015. Novozymes.com>, Acesso em: 24.nov.2018

MARKETS AND MARKETS, Novozymes. Annual Report, (2017). Disponível em: <report2017. Novozymes.com> Acesso em: 24.nov.2018

MARTEN, E.; MULLER, R. J.; DECKWER, W. D.; (2005). Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during fas-induced apoptosis. *Nature methods* , 28, 296

MARTINS. V. G.; BALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. (2008). Co-produção de lipase e biossurfactante em estado solido para utilização em biorremediação de óleo vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*, v. 31(8), p. 1942-1947

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

MESSIAS, J.M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. H.; BARBOSA, A. M., (2011). lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semana: Ciências exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 213-234

METCALF & EDDY. (2003). Wastewater Engineering: treatment and reuse. Metcalf & Eddy inc. 4º ed.

MONTEFRIO, M. J.; XINWEN, T.; OBBARD, J. P.; (2010). Recovery and pre-treatment of fats, oil and frease from grease interceptors for biodiesel production. *Appl. Energy*, 87, 3155

MOUBASHER, Abdel-Aal H., et al. Enzyme producing capabilities of some extremophilic fungal strains isolated from different habitats of Wadi El-Natron, Egypt. Part 2: Cellulase, xylanase and pectinase. *European Journal of biological research*, (2016) , 6.2: 103-111.

NELSON, D. L.; COX, M. M. (2008). Lehninger – Princípios de Bioquímica, 4º Ed, p. 189-224, Sarvier,

NELSON, D. L.; COX, M. M.(2014). Lehninger – Princípios da bioquímica de Lehninger, *Omega*, 6ª Ed.

NIGAM, P.S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications, *Biomolecules*, v.3, p.597-611

NOGUEIRA, L. A. H., (2011). Será que biodiesel faz sentido? *Energia*. 36, 3659-3666

OLIVEIRA, A. C. D.; VARGAS, J. V. C.; RODRIGUES, M. L. F.; MARIANO, A. B., (2013). Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 15, n. 1, p. 19–26.

OLIVEIRA, S. M. A. C.; VON SPERLING, M., (2005). Avaliação de 166 ETEs em operação no país, compreendendo diversas tecnologias. Parte 1: Análise de desempenho. *Engenharia sanitária e ambiental*, v. 10, n. 4, p. 347-357

OLIVEIRA. J. P.; ANTUNES, P. W. P.; PINOTTI, L. M.; CASSINI, S. T. A. (2014). Caracterização físico-química de resíduos oleosos do saneamento e dos óleos e graxas extraídos visando a conversão em biocombustíveis. *Química Nova*. V. 37, n 4, p. 597-602.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G., (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 8, p. 1031-1051

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. (2005). *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. Barueri: Banole

POPPE, J. K.; (2012). Síntese de ésteres metílicos catalisada por lipase B de *Candida Antarctica* imobilizada em suportes hidrofóbicos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDERFELSER, L. A.; HESSELTINE, C.W.; BENECICT, R. G. (1957). A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiotics Annual*, New York, p. 947-953.

RABBANI. M.; BAGHERINEJAD. M. R.; SADEGHI. H. M.; SHARIAT, Z. S.; ETEMADIFAR. Z.; MOAZEN, F.; RAHBARI, M.; MAFAKHER, L.; ZAGHIAN, S. (2013). Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Braslian Journal of Microbiology*. v. 44, n 4, p. 1113-1119.

RAMANI, K., CHOCKALINGAM, E.; SEKARAN, G. (2010). Produção of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughter house waste as a substrate. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 37: 531-535

RATLEDGE, C.; (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, v. 86, n. 11, p. 807-815

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. (2011). Production and use of lipases in bioenergy : a review from the feedstocks to biodiesel production *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1-16.

RODRIGUES, C.. (2015). *Crescimento e atividade lipolítica de fungos de escuma de caixa de gordura em fermentação submersa e em estado sólido*. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21

SALES, P. S. C.; FONSECA, T. C. S.; AMARAL, F. A. P. C.; SILVA, C. A. A. (2017). Produção de lipase por *Cunninghamella echinulata* UCP 1308 no meio de fermentação submersa em culturas diferentes. *Engevista*, v.19, n.5, p.1340-1351, ISSN 1415-7314

SANTOS, A. M.; SILVA, S. R.; CARVALHO, S. H. V.; SOLETTI, J. I. (2009). Tratamento de efluentes lácteos através de coagulação química e sedimentação. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 6p

SANTOYO, A. B.; RODRÍGUEZ, J. B.; MARTÍN, M. F. M.; MORTE, M. C. M.; MENBRILLERA, G. V. G.; REQUENA, S. O. (2007). *Journal Biotechnol*, 131, s82.

SILVA, A. M. Produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* e formulação de bioproduto para aplicação em tratamento de efluente lácteo. Tese (DOUTORADO EM Engenharia Química). à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2016.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase : a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 166, p. 486-520, 2012

SINGH, R., KUMAR, M., MITTAL, A., & MEHTA, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174

SOARES, M. K. G.; FACUNDES, B. C.; CHAGAS JR, A. F.; SILVA, E. M. Avaliação de atividade lipolítica de micro-organismos isolados do Cerrado tocantinense. *ActaScientiarum. Biological Sciences*, Maringa, v. 37, n. 4, p. 471-475, Oct.-Dec., 2015

SOUZA, A. F.; RODRIGUEZ, D. M.; RIBÉA, D. R.; LUNA, M.A.; LIMA E SILVA, T. A., ANDRADE, R. F.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; 2016. Waste soybean oil and corn steep liquor as economic subtrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *International journal of molecular sciences*. V.17, n.10, p1608

TAE- Novas Tecnologias para tratamento de água e efluentes, Abril/maio de 2018. V.42, ano VII. Disponível em: www.revistatae.com.br. Acesso em: 12.jun.2018

TARASSUK, N. P.; FRANKIL, E. N. *J. Dairy Sci* 2007, 40, 418.

TIQUIA, S. M., TAM, N. F. Y. & HODGKISS. I. J. (1996). Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.*, 93, 249-256

TISS,A.; CARRIÈRE, F & VERGER, R. 2001. *Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity*

TREICHEL, H. Concentration, characterization and application of lipases from *Sporidiobolus pararoseus* strain. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n.1, p. 294-302, 2014

VICENTE, Gemma et al, 2010. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. *Energy & Fuels*, v. 24, n. 5, p. 3173-3178

VICENTE, Gemma et al. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. *Energy & Fuels*, v. 24, n. 5, p. 3173-3178, 2010

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.

VON SPERLING, M. 2005. Tratamento de esgotos domésticos. Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Vol. 1; 2ª Edição Revisada. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 452p. 2005

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M.; 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 138, n.3, p. 663-670.

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

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J., 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova* 21 (6)

ZAWADZKI, R. A. F. O. Desenvolvimento de processo contínuo de pré-hidrólise enzimática de efluente com elevado teor lipídico. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

ZUCCONI, F.; MONACO, A.; FORTE, M.; 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. *Composting of agricultural and other waster*. Elsevier Applied Science Publication, New York

ANEXO A - Meios de culturas

A- Meio Bushnell Haas (BH)

- Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4).....	1g
- Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4)	1g
- Nitrato de Amônia (NH_4NO_3)	1g
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,2g
- Cloreto Férrico (FeCl_3).....	0,05g
- Cloreto de cálcio (CaCl_2).	0,02g
- Água destilada	1L
- Ágar	20g

(pH- 7,0 – 7,2)

B- Meio BDA (Batata – Dextrose - Ágar)

- Batata inglesa descascada	200g
- Ágar	17g
- Água destilada	1L

C- Meio Sabouraud (SAB)

- Peptona 10g
- Glicose 40g
- Ágar 12g
- Água destilada 1L