

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAREN JAQUELINE HASELROTH



PALOTINA

2019

KAREN JAQUELINE HASELROTH

BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO POR MEIO DE
MICROORGANISMOS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, no Curso
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor de Palotina,
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Eliane Hermes

PALOTINA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

H347 Haselroth, Karen Jaqueline
Biodegradação de efluente de abatedouro bovino
por meio de microrganismos com atividade lipolítica /
Karen Jaqueline Haselroth. – Palotina, 2019.
107f.

Orientador: Eliane Hermes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

1. Lipase. 2. Matéria orgânica 3. Pré-tratamento
enzimático. 4. Resíduos. I. Hermes, Eliane.
II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 602



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA -
40001016083P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição de dissertação de Mestrado de **KAREN JAQUELINE HASELROTH** intitulada: **BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO POR MEIO DE MICRORGANISMOS COM ATIVIDADE LIPOLÍTICA**, após terem inquirido a autora e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 29 de Maio de 2019.


ELIANE HERMES

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ADRIANA FIORINI ROSADO

Avaliador Interno (UFPR)


CARLA LIMBERGER LOPES

Avaliador Externo (IAPAR)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me iluminado e me dado forças durante esta caminhada.

À minha orientadora, Professora Dra. Eliane Hermes, pela orientação, dedicação, paciência, amizade e confiança.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dra. Adriana Fiorino Rosado e Prof. Dra. Carla Limberger Lopes. Muito obrigada por aceitaram a fazer parte da banca e disponibilizarem a avaliar esse trabalho.

As Professoras Dras. Dilcemara Zenatti e Raquel Ströher, por ter aceitado o convite de ser suplentes da minha banca.

À minha família, pelo incentivo e por todo o apoio.

Aos colegas de laboratório Ingrid, Poline e Victor, pelo auxílio incondicional nos experimentos.

À Prof. Adriana e Gabriéli por toda dedicação e auxílio na identificação dos microrganismos.

À Prof. Dilcemara pela ajuda e dedicação com a estatística.

À Amanda pela coleta do efluente utilizado no estudo.

À Prof. Leidi por ter permitido o uso do shaker no decorrer dos experimentos.

À Prof. Luciana pela disponibilidade de reagentes necessários durante os experimentos.

Aos técnicos Raquel, Maiara, Aline, Larissa e Guilherme por toda ajuda e paciência.

Aos meus amigos, em especial a vocês, Renan, Ander, Lorrana, Cassia, Ingrid, Poline, Amanda, Fernanda, Sabrina, e Lilian, por toda ajuda, incentivo e conforto transmitidos.

Ao meu namorado, pelo carinho, paciência e incentivo.

À UFPR setor Palotina em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar esta importante etapa da minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, muito obrigada.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

(José de Alencar)

RESUMO

Ao considerar a grande quantidade de efluentes que atualmente é gerada no abate de bovinos, além do alto potencial poluidor proveniente dos mesmos, novas alternativas de tratamento devem ser buscadas visando contornar os sérios danos que estes podem causar ao serem lançados nos corpos hídricos. Uma possibilidade que tem se tornado cada vez mais empregada, é o pré-tratamento dos efluentes com o uso de enzimas microbianas, tais como as lipases. Essas enzimas apresentam grande importância pois promovem a hidrólise de óleos e graxas, resultando em uma melhor eficiência nos tratamentos posteriores. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o pré-tratamento de efluentes de um abatedouro de bovinos por meio de microrganismos produtores de lipase isolados do próprio resíduo. Inicialmente, foi realizada a caracterização físico-química do efluente e a partir desse resíduo foram selecionados e isolados microrganismos com potencial de produção de lipase. Posteriormente, foi realizado o cálculo do índice enzimático dos microrganismos e as três bactérias que apresentaram os maiores índices foram selecionadas para identificação. A bactéria que obteve a maior atividade lipolítica foi utilizada para o preparo do inóculo a ser utilizado na etapa do pré-tratamento do efluente. Para tal, utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR), tendo como variáveis independentes: pH, temperatura e concentração de inóculo e variáveis respostas: atividade lipolítica, demanda química de oxigênio (DQO), óleos e graxas (O&G), ácidos graxos livres, proteína solúvel e pH, ao longo de 72 h. A água residuária de abatedouro bovino apresentou alto potencial poluidor, tendo uma concentração de O&G de 2553,3 mg L⁻¹ e DQO de 8914,4 mg L⁻¹. Das seis culturas microbianas isoladas, três microrganismos foram selecionados, apresentando um alto potencial de produção de lipase, com índice enzimático de 3,50, 3,12 e 2,11 e destes o microrganismo com maior atividade lipolítica (2,46 U mL⁻¹) foi utilizado como inóculo no pré-tratamento, sendo identificado como *Aeromonas hydrophila*. Após 72 h de experimento foram alcançadas atividade lipolítica de 1,40 U mL⁻¹, remoções de 67% de DQO, 59% de O&G, 95% de proteína solúvel, além da produção de 36,0 μmol mL⁻¹ de ácidos graxos livres. Foi possível concluir que o efluente de abatedouro bovino é uma excelente fonte para a obtenção de microrganismos produtores de lipase e que a utilização de enzimas, como lipases bacterianas no tratamento deste efluente se mostra uma alternativa promissora.

Palavras-chave: lipase, matéria orgânica, pré-tratamento enzimático, resíduos.

ABSTRACT

Considering a large amount of effluent that is currently generated in cattle slaughter, besides their high pollution potential, new treatment alternatives should be sought to overcome the serious damage they can cause when discharged into water bodies. An alternative that has become increasingly used is the effluent pretreatment using microbial enzymes, such as lipases. These enzymes are important because they promote the oils and greases hydrolysis, resulting in better efficiency in subsequent treatments. Therefore, this study aimed to evaluate the pretreatment of a cattle slaughterhouse effluents through lipase producers microorganisms, residue isolates. Initially, was performed the physical-chemical characterization of the effluent and from that residue were selected and isolated microorganisms with potential to produce lipases. Subsequently, the enzymatic index of the microorganisms was calculated and three bacterial isolates with the highest indexes were selected for identification. The highest lipolytic activity bacteria was used to prepare the inoculum for the effluent pretreatment stage. For that, a central rotational compound design (DCCR) was used, with this independent variables: pH, temperature and inoculum concentration and responses variables: lipolytic activity, chemical oxygen demand (COD), oils and greases (O&G), free fatty acids, soluble protein and pH, over 72 h. Bovine slaughterhouse wastewater had high polluting potential, with a 2553.3 mg L⁻¹ O&G concentration and an 8914.4 mg L⁻¹ COD. Of the six isolated microbial cultures, three microorganisms were selected, showing a high lipase production potential, with a 3.50, 3.12 and 2.11 enzymatic index and the highest lipolytic activity microorganism (2.46 U mL⁻¹) was used as inoculum in the pre-treatment, identified as *Aeromonas hydrophila*. After a 72 h experiment, was obtained the lipolytic activity of 1.40 U mL⁻¹, 67% COD removal, 59% O&G, 95% soluble protein, and a 36.0 μmol mL⁻¹ free fatty acids production. It is therefore concluded that bovine slaughterhouse effluent is an excellent source of lipase-producing microorganisms and the use of enzymes, as the bacterial lipases, in this effluent treatment is a promising alternative.

Keywords: lipase, organic matter, enzymatic pretreatment, residues.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÃO GERAL DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGICERÍDEO OU A REAÇÃO REVERSA, SÍNTESE, CATALISADA POR LIPASES.....	28
FIGURA 2 – FOTOS ILUSTRATIVAS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO OBSERVADOS NOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.....	48
FIGURA 3 – BACTÉRIA 1: A) BACILOS GRAM NEGATIVOS; B) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS. BACTÉRIA 2: C) BACILOS GRAM NEGATIVOS; D) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS. 3: E) BACILOS GRAM NEGATIVOS; F) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS.....	50
FIGURA 4 - GRÁFICO DE PARETO PARA A ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	55
FIGURA 5 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO PH (A). GRÁFICO DE CONTORNO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (B).....	56
FIGURA 6– GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE DQO..	60
FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA REMOÇÃO DE DQO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INOCULO E PH (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA REMOÇÃO DE DQO EM FUNÇÃO DE PH E TEMPERATURA (B).....	61
FIGURA 8 - GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G..	66
FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (B).....	67
FIGURA 10 – GRÁFICO DE PARETO PARA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.....	71
FIGURA 11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E PH (B).....	72
FIGURA 12 - GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL.....	76

FIGURA 13 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA EFICIENCIA DE REMOÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E PH (B)..... 77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS EM DIFERENTES EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS.....	19
TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO E PADRÕES DE LANÇAMENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS GERADOS EM ABATEDOUROS DE BOVINOS.....	23
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA CONFORME A UNIÃO INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR.....	27
TABELA 4 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LIPASES DE ORIGEM BACTERIANA.....	30
TABELA 5 - APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE LIPASES.....	32
TABELA 6 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ANALISADOS E METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	35
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA SELEÇÃO E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO DOS MICRORGANISMOS.....	40
TABELA 8 - VALORES CODIFICADOS E REAIS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (DCCR).....	44
TABELA 9 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO (DCCR) COM QUADRUPLICATA NO PONTO CENTRAL EM SEUS VALORES CODIFICADOS E REAIS.....	45
TABELA 10 - CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO....	46
TABELA 11 - MÉDIA DO ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE) ENCONTRADO PARA CADA MICRORGANISMO, BASEADO NA RELAÇÃO ENTRE O DIÂMETRO DA COLÔNIA E O DIÂMETRO DO HALO.....	48
TABELA 12 - DADOS DE TESTE DE GRAM, CATALASE E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.....	49
TABELA 13 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS 1, 2 e 3.....	51
TABELA 14- ATIVIDADE LIPOLÍTICA E DOSAGEM PROTEICA PARA CADA MICRORGANISMO.....	52
TABELA 15 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	54
TABELA 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE LIPOLÍTICA.....	55

TABELA 17 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE DQO.....	59
TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE REMOÇÃO DE DQO.....	61
TABELA 19 – TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTE A REMOÇÃO DE DQO COMPARADOS AO OBTIDO NESTE ESTUDO.....	63
TABELA 20 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE O&G.....	65
TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE REMOÇÃO DE O&G.....	67
TABELA 22 – TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTE A REMOÇÃO DE O&G COMPARADOS AO OBTIDO NESTE ESTUDO.....	69
TABELA 23 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E CODIFICADOS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.....	70
TABELA 24 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.....	72
TABELA 25 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E CODIFICADOS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL E EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO.....	75
TABELA 26 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A PROTEÍNA SOLÚVEL...	76
TABELA 27 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO AO pH.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Atividade lipolítica

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne

AGCL - Ácidos graxos de cadeia longa

APHA - American Public Health Association

AGL – Ácidos Graxos Livres

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente.

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

DQO - Demanda Química de Oxigênio

F_{calc} – F calculado (teste “F”)

F_{tab} – F tabelado (teste “F”)

F_{faltadeajuste} - Valor de F tabelado para a falta de ajuste

IE – Índice Enzimático

I – Concentração de inóculo

KH₂PO₄ - Fosfato de potássio

MgSO₄ .7H₂O - Sulfato de Magnésio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NTK – Nitrogênio Total Kjeldahl

O&G - Óleos e Graxas

p/v – Peso por volume

pH - Potencial Hidrogeniônico

rpm – Rotação por minuto

R² – Coeficiente de Determinação

ST – Sólidos Totais

SF – Sólidos Fixos

SV – Sólidos Voláteis

UASB – Upflow Anaerobic Sludge Blanket

UFC – Unidades formadoras de colônia

v/v – Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 PRODUÇÃO E ABATE DE BOVINOS	19
3.2 EFLUENTES GERADOS EM ABATEDOUROS DE BOVINOS.....	20
3.3 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DE EFLUENTES DE ABATEDOUROS BOVINOS.....	23
3.4 ENZIMAS.....	26
3.5 LIPASES.....	28
3.6 PRODUÇÃO DE LIPASES	29
3.7 ATIVIDADE LIPOLÍTICA	31
3.8 APLICAÇÃO DE LIPASES	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	35
4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DA ÁGUA RESIDUÁRIA	35
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA.....	35
4.3.1 pH.....	36
4.3.2 DQO Total.....	36
4.3.3 Óleos e graxas	36
4.3.4 Sólidos totais, fixos e voláteis.....	37
4.3.5 Nitrogênio Total	38
4.3.6 Ácidos Graxos Livres.....	39
4.3.7 Proteína Solúvel	39

4.3.8 Carboidrato.....	40
4.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	40
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	41
4.6 PROCESSO FERMENTATIVO	42
4.6.1 Atividade lipolítica	42
4.6.2 Dosagem proteica.....	43
4.7 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO	43
4.7.1 Preparo do inóculo.....	43
4.7.2 Delineamento experimental	44
4.7.3 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA.....	46
5.2 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	47
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	49
5.4 PROCESSO FERMENTATIVO	52
5.5 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO	53
5.5.1 Atividade lipolítica detectada no efluente de abatedouro bovino	53
5.5.2 Demanda Química de Oxigênio.....	58
5.5.3 Óleos e graxas	58
5.5.4 Ácidos Graxos Livres.....	70
5.5.5 Proteína Solúvel	74
5.5.6 pH.....	79
6 CONCLUSÃO	81
7 SUGESTÕES	82
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE.....	105

1 INTRODUÇÃO

Os efluentes resultantes do processamento de carne estão se tornando uma das principais preocupações do agronegócio, devido a grande quantidade de água utilizada durante o processo de abate e limpeza das instalações (BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2017). Possuem em sua composição elevado teor de lipídeos e proteínas e ao serem lançados nos corpos hídricos podem causar a diminuição do oxigênio dissolvido no meio, alteração da temperatura e aumento da turbidez (MENDES e CASTRO, 2005; ROSA et al., 2009). Em consequência, as legislações referentes ao descarte destas águas residuais em corpos d'água tem sido intensificadas, dada a preocupação com o meio ambiente, sendo obrigatório o tratamento dos efluentes antes do seu descarte (PANDEY et al., 2017; KLAUCANS e SAMS, 2018).

A maioria das indústrias utiliza métodos físico-químicos para a remoção de óleos e graxas durante as etapas de tratamento de seus efluentes, no entanto, estes apresentam como principais desvantagens a geração de lodos impróprios para descarte e a baixa taxa de eficiência (KURNIAWAN et al., 2006; ADULKAR e RATHOD, 2013). Visando solucionar esses problemas, processos alternativos como o uso de enzimas vêm sendo utilizados (DORS et al., 2013; AFFES et al., 2017).

O uso de microrganismos ou suas enzimas no tratamento de águas residuais tem atraído atenção por ser um método capaz de superar as limitações existentes e ecologicamente correto (LEAL et al., 2006; DAMASCENO et al., 2018). Uma importante vantagem das enzimas diz respeito a sua atuação sob condições de reações brandas (JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013). Além disso, para tal aplicação elas não exigem purificação, o que possibilita serem produzidas pela própria indústria, resultando em redução no custo de sua produção (RIGO et al., 2008; VERMA et al., 2012).

As lipases desempenham um importante papel no pré-tratamento de resíduos de abatedouros, pelo fato de hidrolisarem óleos e graxas, reduzindo a quantidade de sólidos suspensos, o que resulta em uma melhor eficiência no tratamento anaeróbio subsequente (DUARTE et al., 2015). São enzimas que apresentam amplo destaque no setor industrial, em especial as lipases microbianas, por sua estabilidade, seletividade e especificidade (SILVA-BEDOYA et al., 2016). Sua síntese é

influenciada por fatores como temperatura de incubação, pH do meio e inóculo (VEERAPAGU et al., 2013).

Visando aumentar a competitividade dos processos biotecnológicos é preciso intensificar pesquisas de novas cepas microbianas que melhor se adaptam às características específicas do efluente em estudo (LIMA, 2015). Uma técnica que tem sido bastante utilizada para a caracterização molecular de bactérias no nível de espécie é o sequenciamento da região do rDNA 16S (WOO et al., 2008). Ademais, é necessário verificar e definir as condições operacionais ideais para uma aplicação eficaz de lipases bacterianas como pré-tratamento das águas residuais. Isso pode ser realizado por meio de um planejamento de experimentos (LIMA, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o pré-tratamento de efluente de um abatedouro de bovinos por meio de microrganismos produtores de lipase isolados do próprio resíduo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a água residual proveniente de abatedouro bovino, quanto as suas características físico-químicas;
- Realizar o isolamento de microrganismos com atividade lipolítica do efluente em estudo;
- Selecionar o microrganismo com maior potencial lipolítico por meio da atividade enzimática;
- Identificar os microrganismos selecionados;
- Avaliar a aplicação do microrganismo selecionado no pré-tratamento do efluente em estudo;
- Determinar o efeito das variações de pH, temperatura e concentração de inóculo, nos parâmetros de atividade lipolítica, DQO, O&G, ácidos graxos livre, proteína solúvel e pH.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO E ABATE DE BOVINOS

A pecuária brasileira é uma das atividades mais importantes do agronegócio, e considerada uma das mais competitivas do mundo (TEIXEIRA e HESPANHOL, 2014; DE CARVALHO e DE ZEN, 2017). Em 2017, segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne representou 30% do PIB do Agronegócio e 6,82% do PIB brasileiro (ABIEC, 2018a).

No ano de 2017, o Brasil se posicionou como o detentor do maior rebanho bovino do mundo com cerca de 221,8 milhões de cabeças, segundo maior consumidor (37,5 kg/habitante/ano) e o maior exportador (2,0 mil de toneladas equivalente carcaça) sendo responsável pela criação de 353.725 vagas de trabalho e renda de milhões de brasileiros (ABIEC, 2018a). Com base nos números registrados em 2018, as estimativas apontam para um crescimento de 10,7% no volume e 11% em faturamento das exportações para 2019 (ABIEC, 2018b). De acordo com Florindo et al. (2015) tal estimativa tem sido impulsionada pela crescente demanda por alimentos em razão do crescimento populacional mundial e pelo desenvolvimento econômico em países emergentes.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), no 3º trimestre de 2018 foram abatidas 8,28 milhões de cabeças de bovinos sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária, sendo que essa quantidade foi 3,7% maior que a do 3º trimestre de 2017. A região que apresentou a maior proporção de abate no período foi a Centro-Oeste, responsável por 37,3% do total, seguida pelas Regiões Norte (21,7%), Sudeste (19,5%), Sul (12,5%) e Nordeste (9,0%).

Com relação ao abate de 292,63 mil cabeças de bovinos a mais no 3º trimestre de 2018 (IBGE, 2018) em relação ao mesmo período do ano anterior, este foi impulsionado por aumentos em algumas Unidades da Federação, sendo que dentre aquelas com participação acima de 1,0%, ocorreram aumentos em: Mato Grosso (+100,24 mil cabeças), Rio Grande do Sul (+71,93 mil cabeças), Tocantins (+52,33 mil cabeças), Rondônia (+52,19 mil cabeças), Paraná (+43,98 mil cabeças), entre outras.

3.2 EFLUENTES GERADOS EM ABATEDOUROS DE BOVINOS

O acréscimo da produção e o elevado número de abates de bovinos no país contribuem diretamente para o aumento da geração dos efluentes líquidos e dos impactos ambientais provenientes desta atividade (CAVALLINI; SILVA e GONZAGA, 2017).

Essa relação é decorrente do grande uso de água durante todo o processo. Diversos autores (SALMINEN e RINTALA 2002; MANIOS et al., 2003; ARRUDA, 2004; PACHECO e YAMANAKA, 2008; CUADROS et al., 2011) afirmam que as águas residuárias de abatedouros são geradas em diferentes etapas do processo de abate, tais como lavagem dos animais, sangria, esfolagem, limpeza das carcaças dos animais e limpeza das salas de abate. Ainda segundo estes autores, estas águas contêm sangue, partículas de pele e carne, excremento, gorduras, pelos, frações misturadas de ossos picados, conteúdo estomacal e resto de vísceras.

Os resíduos líquidos resultantes do processo de abate podem ser divididos em: linha verde, que contém os efluentes líquidos gerados em áreas sem presença de sangue, como na recepção dos animais, nas áreas de lavagem dos caminhões, nos currais, na condução para o abate, na bucharia e na triparia; e a linha vermelha, com os efluentes que contêm sangue resultante de várias áreas e etapas do abate (PACHECO e YAMANAKA, 2008; RIBEIRO, 2010). Além disso, a composição física, química e biológica, bem como sua vazão podem variar conforme a forma de utilização da água no processo produtivo (SENA, 2005).

Estima-se que a atividade de abate de bovinos consome 2,5 m³ de água por animal (CAVALLINI; SILVA e GONZAGA, 2017). Porém, o estudo de Scarassati et al. (2003) destaca que o consumo de água varia muito de um abatedouro e frigorífico para outro, sendo difícil estimar um valor exato, uma vez que a água consumida por animal abatido é diferente de acordo com o tipo de animal e o processo de abate, variando entre 1 e 8,3 m³ (FARZADKIA et al., 2016). Uma parte importante deste valor é descartada como efluente, variando de 0,4 a 3,1 m³ por animal abatido (SADDOUD e SAYADI, 2007; GUREL e BUYUKGUNGOR, 2011). Metcalf e Eddy, (2003) relataram que as taxas de geração de águas residuais podem chegar a 80% do total de água consumida.

Em termos de parâmetros físico-químicos, os efluentes de abate de bovinos apresentam uma elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), além de elevada

Demanda Química de Oxigênio (DQO), principalmente devido a presença de sangue, que apresenta a maior DBO ($200.000 \text{ mg L}^{-1}$) e DQO (375.000 a $400.000 \text{ mg L}^{-1}$) de todos os resíduos líquidos provenientes do processamento da carne (PACHECO e YAMANAKA, 2008; BOTIŞ, 2015).

A DQO é considerada um dos mais importantes parâmetros de monitoramento em instalações de tratamento de águas residuais, uma vez que quanto maior a DQO, maior a quantidade de poluição na amostra de água, portanto condições que promovam o aumento da remoção da DQO são interessantes. Tem por definição a quantidade de oxigênio dissolvido consumido na oxidação dos compostos presentes na amostra por agentes oxidantes, tais como o dicromato (LEE et al., 1999; KOLB, BAHADIR e TEICHGRÄBER, 2017; LI et al., 2018).

Estes efluentes ainda apresentam variações de pH em função do uso de agentes de limpeza ácidos e básicos; variação de temperatura, significativos teores de sal e quantidade significativa de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, sódio, magnésio, ferro, zinco, cobre e outros elementos constituintes das dietas dos animais (SCARASSATI et al., 2003; PACHECO e YAMANAKA, 2008; BUSTILLO-LECOMPTE, MEHRVAR e QUIÑONES-BOLAÑOS, 2016).

Além disso, estes efluentes contêm elevada carga orgânica decorrente da presença de lipídeos, que juntamente com proteínas e carboidratos se caracterizam como um dos principais componentes orgânicos de águas residuárias (PEREIRA et al., 2006; BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2015). A concentração dos lipídeos nessas águas é muito variável e depende das características industriais (Tabela 1).

TABELA 1 - TEOR DE ÓLEOS E GRAXAS EM DIFERENTES EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS.

Indústria	Teor de óleos e graxas (mg L^{-1})	Fonte
Laticínio	4680	Mendes, Pereira e Castro, 2006
	640	Alberton et al., 2010
	3100	Mahdi, Bhattacharya e Gupta, 2012
Processamento de peixe	1470	Alexandre et al., 2011
	2808	Cristovão et al., 2014
	711	Valente et al., 2010
Abatedouro avícola	2403	Damasceno, Cammarota e Freire, 2012
	2005	Dors et al., 2013
Abatedouro bovino	1407	Jensen et al., 2015
Curtume	2339	El-Bestawy et al., 2013
Fábrica de biodiesel	6760	Rocha et al., 2013

FONTE: O autor (2019).

Os lipídeos, são moléculas orgânicas, hidrofóbicas, classificadas como: ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteroides. Os óleos, gorduras e graxas são as moléculas lipídicas mais abundantes na natureza, constituídas de triacilgliceróis formados de três ácidos graxos esterificados a uma molécula de glicerol. O termo graxa inclui gorduras, óleos, ceras e outros constituintes das águas residuárias. As gorduras estão entre os compostos orgânicos mais estáveis e não são facilmente decompostos pelas bactérias (METCALF e EDDY, 2003; VOET e VOET, 2006; PEREIRA et al., 2006; BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008; ALBERTS et al., 2010; HUSAIN et al., 2014).

O despejo de óleos e graxas em corpos d'água provoca sérios danos a esse ecossistema. Além de aumentar a DQO, também podem provocar a formação de filmes na superfície aquática, os quais reduzem a difusão de oxigênio da atmosfera para a água, diminuindo os níveis de oxigênio dissolvido (OD), podendo provocar a morte de peixes e outros organismos aeróbios (MONGKOLTHANARUK e DHARMSTHITI, 2002; TORKIAN, EQBALI e HASHEMIAN, 2003; MENDES e CASTRO, 2005).

Ao considerar o grande volume de água gerado pelas atividades de abate e a complexa composição dos resíduos líquidos resultantes, são sérias as consequências ambientais que surgem decorrentes da não realização de tratamento adequado. Dentre elas, a eutrofização, afetando a ecologia dos corpos de água (BEUX, NUNES e BARANA, 2007; DIAS e CASTRO, 2011; DJEKIC, 2015).

Nesse sentido, para que a disponibilidade de água seja assegurada às futuras gerações, a qualidade de vida nos grandes centros urbanos seja melhorada e os impactos ambientais reduzidos, órgãos governamentais estabeleceram parâmetros de qualidade para o lançamento de efluentes em corpos hídricos (Tabela 2) (OLIVEIRA, COELHO e DE SÁ, 2017).

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO E PADRÕES DE LANÇAMENTO DE EFLUENTES LÍQUIDOS GERADOS EM ABATEDOUROS DE BOVINOS.

Parâmetro	Abate Bovino*	Conama 430 (2011)**	Iap 29 (2018)**
pH	7,2	5 – 9	5 – 9
OG (mg L ⁻¹)	270	50	50
DQO (mg L ⁻¹)	4.000	-	150
DBO (mg L ⁻¹)	2.000	-	50
SS (mg L ⁻¹)	1.600	-	-
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	180	-	-
Fósforo total (mg L ⁻¹)	27	-	-
Temperatura (°C)	-	< 40	< 40

Dados relativos à composição média e os padrões de lançamento referentes a resolução 430 (CONAMA, 2011) e a legislação ambiental do Instituto Ambiental do Paraná -IAP Portaria N° 29 (2018) de efluentes líquidos gerados em abatedouros de bovinos.

FONTE: *Pacheco (2008); **Conama 430 (2011); ***Iap 29 (2018).

3.3 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DE EFLUENTES DE ABATEDOUROS BOVINOS

Para a obtenção de um efluente final que obedeça aos padrões de lançamento em corpos hídricos receptores, é necessário associar diversos níveis de tratamento, devido sua composição (CHAN et al., 2009; HARRIS e MCCABE, 2015).

Tais métodos devem levar em conta o tipo, a composição do efluente e os padrões que se pretende atingir, pois afetam diretamente a escolha do processo a ser empregado (anaeróbio ou aeróbio), os custos operacionais associados e o desempenho do sistema. Sem uma caracterização adequada, pode ocorrer um sub ou superdimensionamento da estação de tratamento, resultando em um sistema inadequado ou ineficiente (METCALF e EDDY, 2015).

Com base nessas informações, o tratamento de águas residuárias pode dividir-se em preliminar, primário, secundário e terciário, utilizando métodos físicos, químicos ou biológicos (MENDES et al., 2005; BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2017; PANDEY et al., 2017).

No tratamento preliminar, por ação de processos físicos ocorre a remoção dos sólidos em suspensão, partículas grandes, areia e lipídeos da porção líquida. As operações unitárias mais comuns incluem grades, desarenadores (caixa de areia), caixas de retenção de óleo e gordura, peneiras e filtros (MENDES et al., 2005; MITTAL, 2006).

Nas águas residuais, as moléculas de óleos e graxas podem se apresentar em uma forma emulsionada. Uma emulsão consiste em uma mistura de dois líquidos

não miscíveis, neste caso a água e o óleo, no qual um fica disperso sob a forma de gotículas esféricas (McCLEMENTS e DECKER, 2000). Na remoção dos lipídeos não emulsionados, geralmente são utilizadas caixas de gordura com remoção mecânica, em que a gordura, menos densa, permanece na superfície do tanque enquanto os compostos sólidos tendem a sedimentar. Para o melhor funcionamento dessas caixas deve-se evitar temperaturas superiores a 35 °C e valores de pH acima de 8,5 na alimentação da caixa, pois nessas condições pode ocorrer a saponificação ou emulsificação da gordura. Também devem ser evitadas temperaturas muito baixas para não haver solidificação da gordura, principalmente a de origem animal (MENDES et al., 2005; VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007).

A remoção de lipídeos na forma de emulsão pode ser realizada inicialmente pelo tratamento primário, e posteriormente pelo secundário (PRIMASARI et al., 2011). O tratamento primário consiste na remoção de matéria orgânica em suspensão que pode ser realizado através de decantação, flotação ou coagulação, por ação de fatores físico-químicos (DE SENA, MOREIRA e JOSÉ, 2008; DE NARDI, FUZI e DEL NERY, 2008). Destes, a flotação por produtos químicos ou ar dissolvido é a mais utilizada na retirada de lipídeos (DE SENA, MOREIRA e JOSÉ, 2008). Apesar da eficiência de remoção melhorar significativamente, a flotação apresenta elevados custos operacionais além de gerar lodo químico, que deve ter uma destinação adequada. Ademais, ao serem encaminhados para o tratamento secundário os efluentes podem afetá-lo, visto que a adição de produtos químicos pode inibir a ação microbiana do mesmo (MENDES et al., 2005; ROSA, CAMMAROTA, FREIRE, 2006).

Segundo BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR (2017) os tratamentos preliminares e primários não são suficientes para tratar completamente e adequar as águas residuárias da indústria de carne aos padrões estabelecidos pela legislação. Desta forma, o tratamento secundário é utilizado para a remoção da matéria orgânica dissolvida e em suspensão, remanescentes do tratamento primário.

O tratamento secundário abrange os processos biológicos anaeróbio e aeróbio. O sistema anaeróbio ocorre na ausência de oxigênio dissolvido, através da decomposição da matéria orgânica por microrganismos produzindo gás metano e dióxido de carbono (ADEKUNLE e OKOLIE, 2015). Existem diferentes operações de unidades anaeróbias, como por exemplo, o reator de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB), digestor anaeróbio, filtro anaeróbio, lagoa anaeróbia e o reator compartimentado (MITTAL, 2006; BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2015). Já no

aeróbio, os microrganismos utilizam oxigênio livre ou dissolvido para converter os compostos orgânicos em biomassa e dióxido de carbono. Destacam-se o reator biológico rotativo de contato, reator sequencial em batelada, lagoa aeróbia e reator de lodo ativado (KESKES et al., 2012; BOTIŞ, 2015).

O processo de tratamento anaeróbio é preferível devido ao menor consumo de energia, alta remoção de DQO, além da produção de biogás (DEMIREL, YENUGUN e ONAY, 2005; RANI et al., 2012). No entanto, o alto teor de óleos e graxas (O&G) presente nesses efluentes pode provocar a desestabilização e redução da eficiência do tratamento anaeróbio, uma vez que favorece o desenvolvimento de lodo com baixa taxa de conversão do substrato devido a adsorção de gorduras ao floco, o que aumenta a resistência de transferência de massa (PEREIRA et al., 2005; JEGANATHAN; NAKHLA E BASSI, 2007).

A água residuária com excesso de carga lipídica pode provocar a formação de lodo com características físicas inadequadas e com elevada tendência de flotação, devido ao acúmulo de gases, além de poder provocar a formação de espuma nos biodigestores (JEGANATHAN; NAKHLA e BASSI, 2007; BOROWSKI e KUNACKI, 2015). Ademais, em temperaturas mais baixas os lipídeos podem solidificar e causar danos operacionais associados a obstruções de bombas e tubulações e odores desagradáveis (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; KLAUCANS e SAMS, 2018). No trabalho de Yasin, Mumtaz e Hassan (2013), os autores observaram que a presença de lipídeos em um biorreator anaeróbio resultou em problemas de flotação, entupimento e de transferência de massa.

O efluente com elevadas concentrações de O&G também pode ocasionar a redução da atividade dos microrganismos acetogênicos e metanogênicos devido ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), uma vez que o consumo desses substratos lipídicos pelas bactérias é baixo (MARTÍNEZ et al., 2012; NOUTSOPOULOS et al., 2013; SALAMA et al., 2019). Segundo os autores Hwu et al. (1998) e Alves et al. (2001), a inibição por AGCL pode ocorrer através de sua adsorção na membrana bacteriana, impedindo o transporte de substratos e produtos pela mesma, ou então, dificultando sua função de proteção, levando à morte celular. Embora estes microrganismos possam ser aclimatados aos teores de O&G, este é um processo geralmente lento, aumentando o tempo necessário para a aclimação com o acréscimo da concentração de lipídeos (FERNANDEZ e SANCHEZ, 2005).

Dentre os sistemas de tratamento biológico aeróbio, destaca-se o processo de lodo ativado. Seu funcionamento baseia-se no fornecimento de oxigênio para que os microrganismos, que se organizam em flocos, degradem a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, gerando ao final do processo gás carbônico e água. Entretanto, o alto teor de O&G nesse sistema pode reduzir a capacidade de trocas gasosas, possibilitando o desenvolvimento de bactérias filamentosas dificultando a sedimentação do lodo, e conseqüentemente afetando o desempenho do sistema (JUNG, CAMMAROTA e FREIRE, 2002; CAMMAROTA e FREIRE, 2006). Além disso, de acordo com CHIPASA e MĘDRZYCKA (2006) os lipídeos são mais lentamente degradados pelos microrganismos em comparação às outras moléculas orgânicas, aumentando o tempo de detenção hidráulica do sistema.

Para superar tais limitações, uma alternativa aos tratamentos prévios convencionais que tem atraído crescente interesse é o uso de pré-tratamento enzimático, especificamente por meio de lipases, visto que podem reduzir significativamente o teor de O&G no efluente. Com isso, pode-se melhorar o desempenho da população microbiana nos últimos estágios do tratamento biológico, além de respeitar as rigorosas regulamentações ambientais, por ser uma alternativa limpa e sustentável (CAMMAROTA e FREIRE, 2006 ; ROSA et al., 2009; MENDES et al., 2010; VALLADÃO, CAMAMAROTA e FREIRE, 2011; ALEXANDRE et al., 2011; DUARTE et al., 2015; PANDEY et al., 2017; MENG et al., 2017).

3.4 ENZIMAS

A maioria das enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalíticas, chamadas de ribozimas. São consideradas biocatalisadores da natureza, tornando possíveis os processos metabólicos que ocorrem nas células. São sintetizadas nas células e formadas por longas cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, articuladas em estruturas tridimensionais (KOOLMAN e ROEHN, 2005; NELSON e COX, 2011).

As enzimas podem ser obtidas por meio de plantas, animais ou microrganismos, sendo as de fonte microbiana de maior interesse industrial devido ao elevado número de microrganismos produtores, estabilidade da enzima, especificidade do substrato, menor custo de produção, fornecimento regular pela ausência de sazonalidade e facilidade de manipulação genética (CARVALHO et al.,

2005; ROVEDA; HEMKEMEIER e COLLA, 2010; KANMANI; ARAVIND e KUMARESAN, 2015). As enzimas microbianas respondem por 90% do mercado global e seus produtores estão localizados principalmente na Europa e Ásia (GUERRAND, 2017).

A base da classificação das enzimas depende das reações químicas que catalisam. A nomenclatura enzimática foi estabelecida pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), com divisão em seis grupos principais, nas quais estão inclusas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada (Tabela 3).

TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA CONFORME A UNIÃO INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR.

Classes	Função	Subclasses
1-Oxidoredutases	Catalisam reações de oxirredução, envolvendo oxigenações ou adição de elétrons	Desidrogenases Oxidases Catalase Peroxidases
2-Transferases	Catalisam a transferência de grupos de um composto para outro (doador-receptor)	Metiltransferases Glicosiltransferases Aminotransferases
3-Hidrolases	Catalisam a hidrólise de várias reações, atuam em ligações éster, peptídicas e outras funções contendo a ligação CN	Esterases Lipases Fosfatases Proteases
4-Liases	Catalisam reações de clivagem de ligações como CC, CN e CO e também os processos reversos	Descarboxilases Aldolase Cetoácidolases Hidratases
5-Isomerases	Catalisam a transferência de grupo de uma posição para outra	Racemases Isomerases Epimerases
6-Ligases	Catalisam a união de ligações CC, CO, CS, CN, ésteres de fosfato e N-metal	Sintetases Carboxilases

Fonte: Devlin (2007).

Com a escolha da enzima adequada é possível controlar os produtos requeridos e minimizar as reações indesejáveis. Isso ocorre devido a diversas características enzimáticas, tais como especificidade sobre determinado substrato, atuam em altas e baixas concentrações de contaminantes, ampla faixa de pH, temperatura e salinidade, ausência de atrasos associados à aclimação da biomassa e aumentam a taxa de reação, diminuindo a energia de ativação das moléculas (JOHNSON, 2013; RAY e ROSELL, 2017; SARMAH et al., 2018).

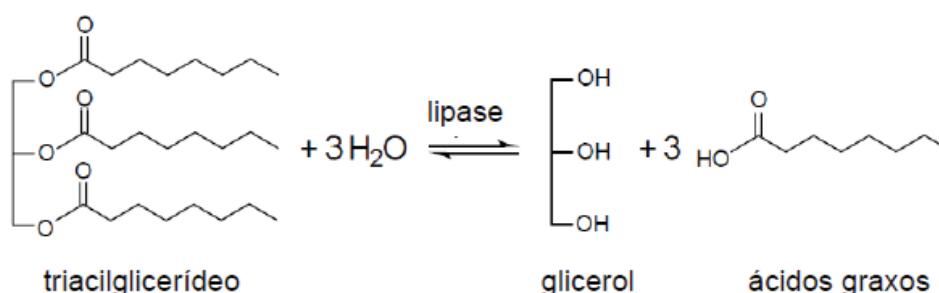
O mercado mundial de enzimas encontra-se em forte expansão. Em 2016 foram movimentados entre 5 e 5,5 bilhões de dólares em enzimas industriais e é

esperado uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,7% ao ano, alcançando cerca de US \$ 6,3 bilhões no ano de 2021 (SINGH et al., 2016; GUERRAND, 2017; DEWAN, 2017). As lipases e esterases são responsáveis por 10% desse mercado, correspondendo ao terceiro grupo mais vendido no mundo, após carboidrases (50%) e proteases (25-30%) (GUERRAND, 2017).

3.5 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C.3.1.1.3), são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações ésteres de triacilgliceróis, produzindo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, gliceróis e ácidos graxos, atuando na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa (Figura 1) (LINKO et al., 1998; GUPTA; GUPTA e RATHI, 2004; ALMEIDA,TAUK-TORNISIELO e CARMONA, 2013; LEE et al., 2015). Estas enzimas podem atuar também como catalisadores em reações de esterificação ou transesterificação, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese. Desta forma, a hidrólise de O&G é favorecida pela presença de água (MILLER et al., 1988; ARPIGNY; JAEGER, 1999; BARROS, FLEURI e MACEDO, 2010; ESCOBAR-NIÑO et al., 2014; KANMANI; ARAVIND e KUMARESAN, 2015).

FIGURA 1 - REAÇÃO GERAL DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICERÍDEO OU A REAÇÃO REVERSA, SÍNTESE, CATALISADA POR LIPASES.



FONTE: Jaeger e Reetz (1998).

Para classificar enzimas lipolíticas como lipases “verdadeiras”, dois critérios têm sido utilizados: a enzima deve apresentar ativação interfacial, ou seja, deve ser ativada pela presença de uma interface lipídeo-água, aumentando significativamente sua atividade assim que o substrato formar uma emulsão; deve possuir uma α -hélice

(cadeia de aminoácidos), chamada de tampa (lid) hidrofóbica cobrindo o sitio ativo, que é então movimentada em contato com a interface (JAEGER e REETZ, 1998; SECUNDO et al., 2006; MESSIAS et al., 2011).

Entretanto, tais critérios são inadequados para classificar as enzimas como lipolíticas, visto que diversas enzimas foram ativas em substratos não emulsionados e não apresentaram ativação interfacial mesmo possuindo a tampa (JAEGER; REETZ, 1998). Por este motivo, as lipases, geralmente, são classificadas como carboxilesterases, que catalisam preferencialmente a hidrólise de triacilglicerídeos de cadeia longa com dez ou mais átomos de carbono insolúveis em água, diferenciando-se das esterases que atuam sobre triacilglicerídeos de cadeia curta solúveis em água. Deve-se ressaltar que a maioria das lipases são capazes de hidrolisar os substratos das esterases, já o contrário não é possível (BORNSCHEUER, 2002; ROMANO et al., 2015).

3.6 PRODUÇÃO DE LIPASES

Lipases são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser produzidas por meio de fontes de origem microbiana, vegetal ou animal (BARROS et al., 2010; SAADATULLAH et al., 2018). No entanto, do ponto de vista econômico e industrial, as lipases microbianas são preferíveis às de fontes animais e vegetais, sendo amplamente usadas em diferentes aplicações biotecnológicas devido a facilidade de manipulação genética, estabilidade, seletividade, ampla especificidade de substrato e facilidade de isolamento, pois em sua maioria são extracelulares (CASTRO, MENDES e SANTOS, 2004; HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; ANBU et al. 2011; CHOUDHURY e BHUNIA, 2015; SILVA-BEDOYA et al., 2016).

Ao considerar as diversas vantagens que as lipases bacterianas apresentam a busca por novas lipases a partir de fontes naturais tem sido impulsionada (LI et al., 2016). Bactérias lipolíticas têm sido encontradas e isoladas de diversos ambientes, como em efluentes de laticínios (PEIL et al., 2016), abatedouros (BALDO et al., 2013), fábricas de processamento de óleo vegetal (ROCHA et al., 2013) e solo contaminado com óleo (LEE et al., 2015; PATEL e DESAI, 2018).

A biossíntese das lipases pode ser influenciada por vários fatores físicos e químicos, como temperatura, pH, agitação, aeração e tempo de incubação, sendo o conhecimento dessas propriedades de fundamental importância para a obtenção de

alto rendimento na produção de lipases (SALIHU e ALAM, 2012; LAI et al., 2019). A Tabela 4 apresenta-se alguns exemplos de lipases obtidas de fontes bacterianas e suas respectivas propriedades físico-químicas.

TABELA 4 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LIPASES DE ORIGEM BACTERIANA.

Microrganismo	pH	Temp (°C)	Massa (KDa)	Referência
<i>Bacillus methylotrophicus</i> PS3	7,0	55	31,4	(SHARMA et al., 2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,3	50	30	(IZRAEL-ZIVKOVIC et al., 2009)
<i>Thermobifida fusca</i>	8,0	60	29	(CHEN et al., 2008)
<i>Bacillus</i> sp. MPTK 912	8,0	35	66	(MUKESH-KUMAR et al., 2012)
<i>Pseudomonas gessardii</i>	7,0	37	--	(VEERAPAGU et al., 2013)
<i>Staphylococcus</i> sp.	8,0	38	45	(DAOUD et al., 2013)
<i>Microbacterium</i> sp.	8,5	50	40	(TRIPATHI et al., 2014)
<i>Bacillus megaterium</i>	7,0	35	--	(FESTUS e PHEBE, 2017)
<i>Acinetobacter baylyi</i>	8,0	60	30	(UTTATREE et al., 2010)
<i>Streptomyces exfoliates</i> LP10	6,0	37	60	(ALY et al., 2012)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7,5	40	28	(EDUPUGANTI et al., 2017)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	7,5	55	45	(SABAT et al., 2012)

FONTE: O autor (2019).

A temperatura ótima para produção de lipases é muito ampla. Na literatura, encontram-se temperaturas ótimas desde 15 a 80 °C (PATIL et al., 2011; KIRANA et al., 2016; JAVED et al., 2018). O estudo da melhor temperatura de atuação de lipases tem como objetivo identificar o estado termodinâmico mais estável, de forma a preservar a estrutura tridimensional (evitar a desnaturação) e favorecer o aumento da atividade lipolítica (LEHNINGER, 1986). O pH também é um importante fator na produção de lipase e pode variar em diferentes microrganismos, apresentando atividade máxima em pH entre 5 e 10 (RAMANI et al., 2010; PATIL et al., 2011; KIRANA et al., 2016; JAVED et al., 2018). Outro fator que apresenta influência é a taxa de agitação, visto que um aumento da mesma melhora a taxa de transferência de oxigênio e a eficiência da reação. No entanto, altas taxas de agitação podem ocasionar estresse de cisalhamento, levando a efeitos negativos sobre o crescimento celular (LIU et al., 2011). De acordo com estudos, a taxa de agitação pode variar de 100 a 250 rpm (SALIHU e ALAM, 2012). Com relação ao período de incubação necessário para atingir o máximo de produção de lipases, este varia de acordo com a espécie, podendo ser de 24 até 96 h (VISHNUPRIYA et al., 2010; DUZA e MASTAN, 2014).

O processo de obtenção das lipases envolve também condições nutricionais, como tipo e concentração de carbono e nitrogênio, surfactantes e íons metálicos (RAY

e ROSELL, 2017). A fonte de carbono tem sido relatada como o principal fator para expressão da atividade lipolítica pois as lipases são, em geral, enzimas indutíveis e, portanto, são produzidas na presença de um lipídeo como o óleo, ou qualquer outro indutor, como triacilgliceróis, ácidos graxos, glicerol e Tweens (VEERAPAGU et al., 2013; ALHAMDANI e ALKABBI, 2016). Como fonte de nitrogênio, a peptona, triptona e o extrato de levedura estão entre os elementos mais utilizadas para a síntese de lipases (GUPTA, GUPTA E RATHI, 2004; SOLEYMANI et al., 2017).

As lipases bacterianas podem ser produzidas tanto por fermentação submersa, como por fermentação em estado sólido. Assim como outras enzimas de interesse industrial, têm sido produzidas principalmente por fermentação submersa, que faz uso de um meio de cultura líquido, o que facilita a recuperação de enzimas extracelulares através de filtração simples ou centrifugação (GUPTA; GUPTA e RATHI, 2004; VEERAPAGU et al., 2013; ROBINSON, 2015; SUCI, ARBIANTI e HERMANSYAH, 2018).

3.7 ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A atividade de lipases pode ser determinada direta ou indiretamente pelo consumo do substrato ou pela formação dos produtos (liberação de ácidos graxos) (GONÇALVES, 2007). Diversos métodos, quantitativos e qualitativos, foram desenvolvidos para medir a atividade em soluções de lipase bruta ou purificada, não existindo um método universal de ensaio de lipase (GUPTA; GUPTA e RATHI, 2004).

Um dos métodos qualitativos é o cultivo em meio sólido suplementado com triacilglicerídeos que consiste em obter halo diferenciado ao redor da colônia do microrganismo, por meio da atuação da enzima sobre substratos indutores que foram adicionados ao meio, como óleos vegetais, tributirina e Tween (CARDENAS et al., 2001; DAMASO et al., 2008). Além disso, com a formação do halo é possível quantificar o Índice Enzimático (IE), que pode ser expresso pela relação entre o diâmetro do halo de degradação do substrato e o diâmetro de crescimento da colônia do microrganismo (HANKIN, ZUCKER e SANDS, 1971; HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

Dentre os métodos quantitativos para a determinação da atividade lipolítica, o mais comum é o método titulométrico, no qual é realizado a titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no caldo fermentado bruto,

sobre os triglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em goma arábica (FREIRE et al., 1997; CARDENAS et al., 2001). A atividade da lipase é definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 μmol de ácido graxo livre do óleo por minuto, nas condições do teste, que é dependente da concentração de substrato do meio, pH e temperatura ótimos da enzima e tempo de reação de hidrólise (GONÇALVES, 2007).

Outro método quantitativo é o espectrofotométrico, que se baseia na hidrólise lipolítica do p-nitrofenilpalmitato em p-nitrofenol e ácido palmítico, resultando em coloração amarela que é intensificada em pHs alcalinos. O p-nitrofenol liberado é detectado em espectrofotômetro a 410 nm (GILHAM e LEHNER, 2005). No entanto, segundo Gilham e Lehner (2005) a utilização deste método não é indicada no caso de extratos enzimáticos, sendo mais recomendado para o emprego em amostras de lipase purificada, por não conterem substâncias interferentes.

3.8 APLICAÇÃO DE LIPASES

Devido a capacidade das lipases catalisarem diversas reações, apresentam grande potencial biotecnológico, sendo utilizadas em diversas aplicações industriais, como na indústria alimentícia, de detergentes e farmacêutica (Tabela 5) (HASAN et al., 2006; TACIN et al., 2019).

TABELA 5 - APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE LIPASES.

Indústria	Aplicação	Referência
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	(GANDHI et al., 2018)
Panificação	Aumento do aroma e da vida de prateleira	(CHRISTOPHER e KUMBALWAR, 2015)
Cervejaria	Aceleração da fermentação em função dos lipídeos	(GUERRAND, 2017)
Carne	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura	(RAY, 2012)
Farmacêutica	Síntese de intermediários de medicamentos	(CARVALHO et al., 2015)
Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue	(REZVANI et al., 2017)
Papel e celulose	Tratamento de polpas de celulose	(SINGH et al., 2016)
Tratamento de resíduos	Biodegradação de substâncias oleosas	(AFFES et al., 2017)
Detergentes	Hidrólise e remoção de óleos e gorduras	(SARASWAT et al., 2017)
Indústria fina	Produção de biodiesel	(LI, DYER e GREENWELL, 2018)
Cosméticos	Síntese	(KHAN e RATHOD, 2015)

FONTE: O autor (2019).

A aplicação de lipases no tratamento de efluentes tem se mostrado uma alternativa promissora, principalmente devido a complexa composição das águas

residuárias provenientes de várias indústrias como de abatedouros, laticínios e indústrias de produtos fritos (LUSTE et al., 2009; MENDES, PEREIRA e FURIGO, 2010; VALENTE et al., 2010; ALEXANDRE et al., 2011; DORS et al., 2013; CAVALEIRO et al., 2013; DUARTE et al., 2015). Para esta aplicação, as lipases podem ser utilizadas sem purificação, apresentando uma vantagem econômica (MENDES et al., 2005; RIGO et al., 2008).

Segundo os autores Valente et al. (2010) e Affes et al. (2017) um pré-tratamento de efluentes com elevadas concentrações de O&G por meio da ação das lipases pode auxiliar na remoção de filmes oleosos em tubulações, proporcionando o aumento da vida útil de equipamentos. Além disso, possibilita a redução de sólidos suspensos e triacilgliceróis, garantindo melhores condições em uma etapa posterior de tratamento biológico, uma vez que a ação microbiana será favorecida, tendo acesso às moléculas que são mais facilmente degradadas, consequentemente reduzindo o tempo de detenção hidráulica no sistema (VALENTE et al., 2010).

De fato, diversos autores relataram bons resultados utilizando lipases para tratar águas residuais lipídicas. Mendes et al. (2006) investigaram o pré-tratamento enzimático de águas residuais lácteas ricas em lipídeos e posterior biodigestão anaeróbia. A lipase utilizada foi uma preparação bruta de lipase de pâncreas suíno com atividade de 1770 U mg^{-1} de sólido. Com a utilização da enzima a 0,5% p/v por 24 h foi possível verificar o efeito do pré-tratamento na formação de alto teor de biogás ($445 \pm 29 \text{ mL}$) e na remoção de DQO (80,9%).

Mobarak-Qamsari et al. (2012) avaliaram o efeito do pré-tratamento de efluentes lácteos sintéticos com teor de gordura total de 1000 mg L^{-1} utilizando extrato enzimático de *Pseudomonas aeruginosa*, e posterior digestão anaeróbia. Os autores verificaram que, a utilização do biorreator descontínuo alimentado com águas residuais pré-hidrolisadas com 10% v/v de lipase apresentando atividade de $0,3 \text{ U mL}^{-1}$ durante 48 h foi eficiente na remoção de DQO (90%), comparado ao efluente bruto (66%). Além disso, a produção de biogás após 13 dias também apresentou resultados satisfatórios, aumentando de 2330 mL para 4710 mL.

Rigo et al. (2008), com o objetivo de reduzir o teor de O&G contido no efluente de uma indústria de carne bovina e suína, empregaram duas lipases, uma comercial (Lipolase 100T, Novozymes) e uma obtida por fermentação em estado sólido (Lipase SEP). As águas residuárias com diferentes concentrações de O&G (250 a 3000 mg L^{-1}) foram tratadas em reatores anaeróbios em batelada com e sem pré-

tratamento enzimático, utilizando duas quantidades de preparações enzimáticas [0,1 e 5,0% (p / v)]. Os benefícios da pré-hidrólise enzimática tornaram-se evidentes quando houve o uso de 0,1% (p/v) da lipase SEP, em águas residuais contendo 1200 mg L⁻¹ de O&G, apresentando um aumento de 22% na remoção da DQO, comparado a um reator de controle alimentado com água residual sem nenhum pré-tratamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Química Analítica e Análises Ambientais da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Setor Palotina.

4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DA ÁGUA RESIDUÁRIA

A água residuária utilizada nos experimentos foi obtida de um abatedouro bovino localizado em um município do Noroeste do estado do Paraná. A indústria possui uma capacidade de abate de até 56 bovinos dia⁻¹, com área construída de 600 m², sendo considerado um frigorífico de pequeno porte. As amostras foram coletadas em galões plásticos (para o pré-tratamento) e em frascos de vidro previamente autoclavados (para isolamento microbiano) da caixa de retenção de gordura que compõem o sistema de tratamento da indústria. Até o momento de uso, os galões foram armazenados sob refrigeração, a -20 °C, enquanto os frascos a 4 °C.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA

Foram realizadas análises das características físico-químicas iniciais da água residuária em estudo, quanto aos parâmetros de pH, DQO, O&G, sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), sólidos fixos (SV), nitrogênio total, ácidos livres, proteína solúvel e carboidrato, seguindo metodologias descritas na Tabela 6. As análises foram realizadas em duplicata.

TABELA 6 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ANALISADOS E METODOLOGIAS UTILIZADAS.

Parâmetro	Metodologia	Referência
pH	Potenciometria	APHA (2005)
DQO Total (mg L ⁻¹)	Espectrofotometria	APHA (2005)
O&G (mg L ⁻¹)	Gravimetria	Suehara et al. (2005)
Sólidos Totais (mg L ⁻¹)	Gravimetria	APHA (2005)
Sólidos Fixos (mg L ⁻¹)	Gravimetria	APHA (2005)
Sólidos Voláteis (mg L ⁻¹)	Gravimetria	APHA (2005)
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹)	Kjeldahl	APHA (2005)
Ácidos Graxos livres (µmol mL ⁻¹)	Titulometria	Rosa (2004)
Proteína Solúvel (mg mL ⁻¹)	Espectrofotometria	Bradford (1976)
Carboidrato (mg L ⁻¹)	Espectrofotometria	Dubois et al. (1956)

FONTE: O autor (2019).

4.3.1 pH

Para determinar o pH das amostras foi utilizado um pHmêtro da marca NS TECNOPON, modelo mPA 220, devidamente calibrado.

4.3.2 DQO Total

Para a determinação da DQO total uma amostra de 2,5 mL (concentrada ou diluída) foi adicionada em tubos de borossilicato com tampas rosqueáveis, ou 2,5 mL de água destilada (para o branco), ou das soluções de padrão preparadas para a curva de calibração. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL da solução de dicromato de potássio e, vagarosamente, 3,50 mL da solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico. O tubo foi então fechado hermeticamente e agitado por inversão. Colocou-se os tubos no digestor previamente aquecido à temperatura de 150 °C, e mantendo-o durante 2 h. Após resfriamento dos tubos, foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro da marca Femto, modelo 600 s com comprimento de onda em 620 nm, zerando o equipamento com o branco. Para obtenção da curva de calibração, plotou-se as absorvâncias das soluções do padrão no eixo Y contra os valores de DQO em mg L⁻¹ das soluções de biftalato ácido de potássio no eixo X, e determinou-se a equação da reta obtida.

4.3.3 Óleos e graxas

Para a determinação de óleos e graxas foi utilizada a metodologia proposta por Suehara et al. (2005), no qual foi adicionado em um tubo cônico uma alíquota de 15,0 mL da água residuária, e esta foi acidificada com 0,18 mL de HCl 2N, previamente preparada. Em seguida foi adicionado 1,5 mL de éter e centrifugado em centrífuga da marca NOVA instruments, modelo NI1812 por 5 min a 3.000 rpm. Após centrifugada a amostra, foi retirado, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o sobrenadante e este foi colocado em um Becker previamente pesado (M_1). O procedimento de acidificar, adicionar o éter e centrifugar foi repetido 3 vezes. O Becker foi levado a estufa a 80 °C por 24 h, em seguida o Becker com a amostra foi levado ao dessecador a fim de alcançar a temperatura ambiente, e posteriormente a isso foi pesado para obter o (M_2). Os dados obtidos foram substituídos na equação 1.

$$\text{O\&G (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(M_2 - M_1) \times 1000}{V_1 \text{ (mL)}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

M_1 = Massa do becker vazio

M_2 = Massa do becker e amostra retirado da estufa

V_1 = Volume do efluente inserido no cadinho (mL)

$\times 1000$ = transformar de gramas para miligramas.

4.3.4 Sólidos totais, fixos e voláteis

Para a análise da concentração dos sólidos totais (ST), uma amostra de 15 mL foi adicionada aos cadinhos previamente calcinados e de massa conhecida (M_1), em seguida foram levados para estufa com circulação de ar, da marca SOLAB, modelo SL-102, na qual permaneceram por 24 h a temperatura de 105 °C. Após este período a massa do conjunto cadinho e amostra foi determinada em balança analítica da marca SHIMADZU modelo AY220.

Para determinação dos sólidos fixos (SF) e sólidos voláteis (SV), foram levados os conjuntos (cadinho + amostra) até a mufla, onde permaneceram por 90 min a temperatura de 550 °C. Logo em seguida esperou-se que os cadinhos esfriassem em um dessecador e depois estes foram pesados.

Os dados obtidos foram substituídos nas Equações 2, 3 e 4, respectivamente.

$$\text{ST (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{(M_2 - M_1) \times 1000}{V_1 \text{ (mL)}} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\text{SF (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{(M_3 - M_1) \times 1000}{V_1 \text{ (mL)}} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\text{SV (mg. L}^{-1}\text{)} = \frac{(M_2 - M_3) \times 1000}{V_1 \text{ (mL)}} \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que:

M_1 = Massa do cadinho vazio

M_2 = Massa do cadinho e amostra retirado da estufa

M_3 = Massa do cadinho e amostra após combustão da mufla

V_1 = Volume do efluente inserido no cadinho (mL)

ST = Sólidos Totais

SF = Sólidos Totais Fixos

SV = Sólidos Totais Voláteis

4.3.5 Nitrogênio Total

Em um tubo de digestão adicionou-se 5 mL de cada amostra com uma pequena porção (ponta da espátula) de mistura digestora de nitrogênio, composta por sulfato de cobre e sulfato de potássio, e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, este tubo de digestão foi levado a um bloco digestor da marca TECNAL, modelo TE-007MP, no qual aumentou-se gradativamente a temperatura em 50 °C, até atingir a temperatura de 385 °C, mantendo essa temperatura até a amostra ficar na cor azulado-transparente.

Para a destilação, a amostra digerida foi colocada no destilador de nitrogênio da marca TECNAL, modelo TE-0363, onde a amostra foi aquecida previamente. Adicionou-se 25 mL da solução NaOH (40%), no qual foi liberado o nitrogênio na forma de gás, este gás foi recolhido após passar no condensador em 100 mL de ácido bórico 4% e 5 gotas dos indicadores verde de bromocresol 0,1% e vermelho de metila 0,2%, e então foi realizado a titulação com HCl 0,04794 mol L⁻¹ e o volume gasto foi anotado para posterior cálculo.

Com os dados calculou-se a concentração do nitrogênio total através da Equação 5.

$$mgNitrogênio_{(total)} \cdot L^{-1} = \frac{(V_1 - V_2)}{V} \times N_{HCl} \times 14.000 \quad \text{Eq. (5)}$$

Em que:

V_1 = Volume de ácido utilizado para titular a amostra (mL);

V_2 = Volume de ácido utilizado para titular o branco (mL);

V = Volume da amostra (mL);

N_{HCl} = Concentração do ácido utilizado na titulação;

14.0 = Equivalente grama do nitrogênio contido no NH₄.

4.3.6 Ácidos Graxos Livres

Para a determinação de ácidos graxos livres uma amostra de 5 mL foi transferida para um becker e acionado 5 mL de uma mistura de acetona:etanol (1:1v/v). As amostras foram tituladas com solução NaOH 0,01 mol L⁻¹ com fenolftaleína como indicador. O teor final de ácidos graxos livres foi obtido pela Equação 6.

$$\text{AGL}(\mu\text{mol/mL}) = \frac{V_{(\text{NaOH})} * M_{(\text{NaOH})} * 1000}{V_a} \quad \text{Eq. (6)}$$

Em que:

AL = teor de ácidos livres (μmol mL⁻¹);

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

M(NaOH) = concentração da solução de NaOH (mol L⁻¹);

V_a = volume da amostra (mL).

4.3.7 Proteína Solúvel

A dosagem de proteínas totais solúveis foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). O reagente de Bradford foi preparado com 100 mg do corante Coomassie Blue G250 em 50 mL de etanol a 95%. Essa solução foi misturada com 100 mL de ácido fosfórico 85% e diluída com 1 L de água destilada. O reagente foi então filtrado com papel de filtro. Para elaborar a curva-padrão foi utilizada uma solução estoque de soro de albumina bovina em uma concentração de 1 mg mL⁻¹ em água destilada. Para a curva de calibração, foram pipetados volumes de 10, 20, 40, 60, 80, e 100 μL da solução padrão de BSA em tubos de ensaio, completando-se com água destilada até 100 μL. Em seguida, adicionou-se 5 mL de reagente de Bradford a cada tubo de ensaio e agitados no vortex. Foram medidas a absorbância das amostras e do branco (5 mL de reagente de Bradford e 100 μL de água destilada esterilizada) em comprimento de onda de 595 nm entre 2 min e 1 h após a agitação. Para a dosagem proteica do efluente foi utilizado 100 uL do mesmo no lugar da solução de BSA. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.8 Carboidrato

A análise foi realizada de acordo com Dubois et al. (1956). Uma alíquota de 0,5 mL do efluente foi transferido para tubos de ensaio de vidro, adicionado 0,5 mL de solução de fenol 5% e agitado levemente. Em seguida foi adicionado 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado diretamente sobre a amostra e homogeneizado levemente. Após esse processo a amostra foi incubada 20 min a temperatura ambiente para o resfriamento da solução. Uma curva de calibração foi obtida utilizando glicose como padrão. Foram realizadas soluções padrão de glicose através de diluições seriadas (a partir de uma solução de 50 mg L⁻¹) nas seguintes concentrações: 5, 10, 15, 20, 25, 30,35, 40, 45 e 50 mg L⁻¹. Após o preparo de todos os padrões e amostras, foram realizadas leituras da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, para gerar a curva de calibração. Para o preparo do branco foi utilizado 0,5 mL de água destilada como amostra.

4.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

A seleção dos microrganismos foi realizada utilizando-se a técnica de diluição em série de amostras do efluente de abatedouro bovino em solução salina 0,8%. Alíquotas de 100 µL das diluições com concentração 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ foram inoculadas, por espalhamento, em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo descrito por Sierra (1957), conforme apresentado na Tabela 7, esterilizando o Tween separadamente dos demais reagentes. As placas foram incubadas por 48 h a 30 °C para o crescimento dos microrganismos. As bactérias que apresentaram halo de degradação (método qualitativo de atividade lipolítica), foram isoladas em placas contendo ágar nutriente através do método *Streak-Plate* (esgotamento) (BECKER, CALDWELL e ZACHGO, 1996) e mantidas em BOD a 30 °C.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA SELEÇÃO E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO DOS MICRORGANISMOS.

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

Posteriormente ao isolamento das bactérias foi determinado o IE das mesmas. Para isso, uma alçada de cada bactéria foi inoculada em placa de Petri contendo um meio de cultura específico (Tabela 7). As placas foram incubadas a 30 °C por 96 h e o IE foi determinado após este tempo, mensurando-se o diâmetro médio do halo de degradação e diâmetro médio da colônia pelo método de Hankin e Anagnostakis (1975):

$$IE = D^H / D^C \quad \text{Eq. (7)}$$

Em que:

IE = Índice Enzimático

D^H = Diâmetro médio do Halo de Degradação

D^C = Diâmetro médio da Colônia

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Após o cálculo do IE foram selecionadas, para a identificação, três bactérias que apresentaram os maiores índices. Os isolados foram primeiramente caracterizados com base nos aspectos morfo-tintoriais e bioquímicos, através da coloração de Gram e teste da catalase. A caracterização molecular foi realizada através do sequenciamento da região do gene do RNA ribossomal 16S (rDNA 16S), para definição no nível de gênero e espécie.

O DNA dos isolados bacterianos foi extraído utilizando o kit FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), e a confirmação da espécie foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento. Para o sequenciamento, a região rDNA 16S foi amplificada por PCR utilizando os *primers* Y1 *forward* (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'), conforme Young et al. (1991) e Y3 *reverse* (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTC-3'), segundo Cruz (2001), produzindo um *amplicon* de aproximadamente 1500 pb. As condições de amplificação foram: 5 min iniciais a 94 °C, e 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 57 °C e 45 s a 72 °C, como extensão final de 5 min a 72 °C.

Os produtos de PCR foram purificados por eluição em gel de agarose, usando o kit de extração Easypure. Uma alíquota de 2 µL dos produtos de PCR eluídos foi quantificada com o auxílio de espectrofotômetro Nanodrop2000 (ThermoScientific). O

grau de pureza foi determinado pela relação A260/280. Após quantificação, 60 ng do produto de PCR juntamente com 0,45 pmol dos *primers forward* e *reverse* foram secos em estufa e enviados para a empresa Ludwig Biotecnologia (Alvorada, RS), para a realização do sequenciamento, usando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2013) e os resultados de cada amostra foram analisados utilizando o BLASTn (Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico - versão 2.215 do BLAST 2.0).

4.6 PROCESSO FERMENTATIVO

Os três microrganismos que apresentaram os maiores índices enzimáticos foram cultivados em erlenmeyers de 250 mL em agitador-incubador a 150 rpm e 37 °C por 24 h contendo 50 mL do meio de cultura proposto por Bueno et al. (2014) com modificações: extrato de levedura (2 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹), KH₂PO₄ (3,0 g L⁻¹), MgSO₄ .7H₂O (0,2 g L⁻¹) e 1% (v/v) de óleo de soja. A suspensão de células obtida foi padronizada em 1,0 de absorvância em espectrofotômetro em 600 nm de comprimento de onda e inoculada 5 mL da suspensão padronizada em outro erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio descrito anteriormente e nas mesmas condições anteriores. O cultivo foi interrompido por centrifugação (15 min a 3000 rpm) e o sobrenadante foi usado para análise da atividade lipolítica e dosagem proteica.

4.6.6 Atividade lipolítica

A determinação da atividade lipolítica foi realizada pelo método titulométrico segundo Dellamora-Ortiz et al. (1997) com modificações, em que utilizou-se 5 mL de emulsão de óleo de oliva 20% (v/v) em goma arábica 5% (p/v) e 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. O ensaio foi realizado em shaker marca CIENLAB, modelo CE-725/R com agitação de 180 rpm, a 37 °C, sendo iniciado pela adição de 3 mL da preparação enzimática e após 20 min de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura etanol e acetona (1:1). Os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão foram quantificados pela titulação com NaOH 0,05 N, aplicando-se fenolftaleína como indicador. Também foi utilizado um branco, contendo 3 mL do tampão fosfato de sódio em vez do preparo

enzimático. A atividade lipolítica foi calculada com a Equação 8 e expressa em micromoles de ácidos graxos liberados, por minuto de reação, por mililitro de amostra.

$$A \text{ (U. mL}^{-1}\text{)} = \frac{V_1 - V_2 * N * 1000}{V_3 * T} \quad \text{Eq. (8)}$$

Em que:

A = atividade enzimática;

V1 = volume de NaOH gasta na titulação da amostra;

V2 = volume de NaOH gasta na titulação do branco;

N = normalidade corrigida do NaOH utilizado;

V3 = volume utilizado do preparo enzimático;

T = tempo de reação (minutos).

4.6.7 Dosagem proteica

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) descrito anteriormente no item 4.3.7.

4.7 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO

4.7.6 Preparo do inóculo

Após a análise da atividade lipolítica dos microrganismos, aquele que apresentou a maior atividade foi utilizado para o preparo do inóculo. Primeiramente fez-se a ativação da bactéria lipolítica selecionada, adicionando-se em erlenmeyers de 250 ml, uma alçada de colônia em 100 mL de meio de cultivo esterilizado contendo: extrato de levedura (2 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹), KH₂PO₄ (3,0 g L⁻¹), MgSO₄ .7H₂O (0,2 g L⁻¹) e 1% (v/v) de óleo de soja. Os erlenmeyers foram inseridos em agitador incubadora shaker da marca CIENLAB, modelo CE-725/R 150 rpm, a 37 °C por 12 h (BUENO et al.,2014; LIMA, 2015).

A suspensão de células obtida foi padronizada por densidade óptica, ajustando-se a absorvância do inóculo em espectrofotômetro a 600 nm de comprimento de onda, pela adição de suspensão celular em solução salina 0,8%, até

alcançar a absorvância de 1,0 e inoculada em outro erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL do efluente em estudo (água residuária de abatedouro bovino) esterilizado. A inoculação foi realizada na proporção de 10% (v/v) e incubada nas mesmas condições anteriormente descritas. A concentração de células nos inóculos foi mensurada pelo método de diluição em placa, inoculando 100 µL da diluição 10^{-6} em placa de Petri contendo ágar nutriente como meio de cultivo.

4.7.7 Delineamento experimental

Para realização do pré-tratamento do efluente em estudo, propôs-se a utilização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Este tipo de delineamento tem como finalidade identificar e otimizar as variáveis que influenciam determinado processo, por meio dos resultados experimentais obtidos nos ensaios elaborados, além de obter a análise de variância (ANOVA) para verificar o ajuste do modelo, superfícies de resposta e gráficos de contorno (GHAEDI et al., 2016).

O planejamento DCCR utilizado contemplou 3 variáveis (pH, temperatura e concentração de inóculo), com os níveis (-1 e +1), os pontos axiais (-1,68 e +1,68) e três repetições no ponto central (0), resultando em 17 ensaios (Tabela 8 e 9). O ponto central fornece uma média para estimar o erro experimental e a falta de ajuste e os pontos axiais estimam a curvatura do modelo (BARROS, SCARMINO e BRUNS, 2007). Os valores de referência das variáveis estudadas foram baseados em dados encontrados na literatura (VALLADÃO, FREIRE e CAMMAROTA, 2007; RIGO et al., 2008; VALENTE et al., 2010; ROCHA et al., 2013; MAZZUCOTELLI et al., 2014; AFFANDI et al., 2014; LIMA, 2015; SONUNE e GARODE, 2018).

TABELA 8 - VALORES CODIFICADOS E REAIS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL (DCCR).

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	6,7	7,0	7,5	8,0	8,3
Temperatura (°C)	26,6	30	35	40	43,40
Inóculo (%)	6,6	10	15	20	23,4

FONTE: O autor (2019).

Na Tabela 9 apresenta-se a matriz do planejamento DCCR, com os valores codificados e reais das variáveis de cada ensaio.

TABELA 9 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO (DCCR) COM QUADRUPPLICATA NO PONTO CENTRAL EM SEUS VALORES CODIFICADOS E REAIS.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais		
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	pH	T (°C)	Inóculo (%)
1	-1	-1	-1	7,0	30,0	10,0
2	-1	-1	1	7,0	30,0	20,0
3	-1	1	-1	7,0	40,0	10,0
4	-1	1	1	7,0	40,0	20,0
5	1	-1	-1	8,0	30,0	10,0
6	1	-1	1	8,0	30,0	20,0
7	1	1	-1	8,0	40,0	10,0
8	1	1	1	8,0	40,0	20,0
9	-1,68	0	0	6,7	35,0	15,0
10	1,68	0	0	8,3	35,0	15,0
11	0	-1,68	0	7,5	26,6	15,0
12	0	1,68	0	7,5	43,4	15,0
13	0	0	-1,68	7,5	35,0	6,60
14	0	0	1,68	7,5	35,0	23,4
15	0	0	0	7,5	35,0	15,0
16	0	0	0	7,5	35,0	15,0
17	0	0	0	7,5	35,0	15,0

FONTE: O autor (2019).

Nesses 18 ensaios, inoculou-se o efluente com concentrações de inóculo determinadas para cada tratamento, obtendo-se em cada erlenmeyer o volume total de efluente e inóculo igual a 100 mL. Os erlenmeyers foram incubados em incubadora shaker por 72 h a 180 rpm, variando-se temperatura e pH conforme determinados nos tratamentos do DCCR. As amostras foram coletadas em 0 h, 24 h, 48 h e 72 h, para o monitoramento dos parâmetros de pH, DQO, teor de O&G, teor de ácidos livres e a atividade lipolítica de acordo com metodologias descritas anteriormente no item 4.3. Para a análise da atividade lipolítica, a amostra coletada era centrifugada a 3000 rpm por 15 min, o precipitado era descartado e o sobrenadante era analisado. Foi realizado um controle para cada um dos 18 tratamentos, sem adição do inóculo. Além disso, avaliou-se o teor de proteína solúvel dos ensaios em 0 h e 72 h de reação, de acordo com metodologia descrita no item 4.3.7.

4.7.8 Análise estatística

O *software* STATISTICA 12 foi utilizado para determinar o efeito das variáveis independentes, o cálculo dos coeficientes de regressão, a análise de variância (ANOVA), utilizando-se do teste F a 5% de probabilidade e a obtenção dos gráficos de superfícies de resposta sobre as variáveis respostas atividade lipolítica, DQO, O&G, ácidos graxos livres e proteína solúvel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA

Os valores obtidos na caracterização do efluente em estudo, bem como dados da literatura de caracterização de efluente de abatedouro bovino são descritos na Tabela 10.

TABELA 10 - CARACTERIZAÇÃO DE EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO.

Parâmetro	Efluente em estudo	Caixeta et al. (2002)	Rigo (2008)	McCabe et al. (2013)	Jensen et al. (2015)
pH	6,48	6,3-6,6	5-6	-	-
Óleos e graxas (mg L ⁻¹)	2553,3 ± 220	40-600	3080	5-2110	1407
DQO (mg L ⁻¹)	8914,4 ± 69,4	2000-6200	32000	1040-12,100	5919
ST (mg L ⁻¹)	5224,4 ± 100,0	-	8462	457-6870	3378
SV (mg L ⁻¹)	4606,7 ± 74,2	-	-	-	-
SF (mg L ⁻¹)	617,8 ± 30,8	-	-	-	2834
Nitrogênio Total (mg L ⁻¹)	1201,7	-	-	296-785	190,2
Ácidos livres (μmol mL ⁻¹)	11 ± 0	-	-	-	-
Proteína Solúvel (mg L ⁻¹)	4805,7 ± 51,3	-	-	-	-
Carboidrato (mg L ⁻¹)	81,2 ± 1,2	-	-	-	-

FONTE: O autor (2019).

De acordo com os autores Caixeta et al. (2002) e Bustillo-Lecompte, Mehrvar e Quiñones-Bolaños (2013) a composição de efluentes de abatedouro bovino podem sofrer variação devido a diversos fatores, como o processo industrial, a quantidade de água utilizada, o tipo e idade do animal abatido, temperatura, entre outros.

Os parâmetros pH e sólidos totais encontram-se dentro do intervalo apresentado na literatura para efluentes de abatedouros bovinos. Quanto as diferenças observadas para os outros parâmetros neste estudo e os valores obtidos pelos autores em questão podem ter vários motivos. No estudo de Caixeta et al. (2002) o efluente foi coletado após passar por um tratamento primário de deposição e flotação, podendo explicar os baixos valores de O&G. Rigo (2008) utilizou o efluente de um matadouro que abate bovinos e suínos, o que possivelmente justifica os valores elevados de O&G e DQO.

Apenas o pH do efluente em estudo apresenta valor dentro dos parâmetros para lançamento de efluente, estabelecidos pela resolução Conama nº 430 (2011), e pela legislação ambiental do Instituto Ambiental do Paraná-IAP Portaria Nº 29 (2018). Enquanto que os demais parâmetros apresentam valores elevados, necessitando de

tratamento prévio ao seu descarte no ambiente, visto que as legislações determinam que a concentração máxima de gordura animal e DQO presente no efluente seja de 50 mg L⁻¹ e 150 mg L⁻¹, respectivamente.

5.4 SELEÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

A presença de atividade lipolítica depende da liberação hidrolítica do ácido graxo do Tween e a sua subsequente precipitação como sal de cálcio (TIGERSTROM e STELMASCHUK, 1989; GOPINATH, ANBU e HILDA, 2005). Por meio da observação dos halos de degradação formados ao redor das colônias, foi possível selecionar e isolar 6 bactérias.

Lee et al. (2015), ao isolar bactérias produtoras de lipase de área de derramamento de óleo, observaram que das 10 estirpes bacterianas selecionadas 7 delas apresentaram halo de precipitação em meio de cultura que continha Tween 20. Silva-Bedoya et al. (2016) verificaram que 5 dos 22 isolados bacterianos se mostraram positivos para a presença de lipase em meio de cultivo com Tween 20.

No estudo de Vieira et al. (2006), que teve como intuito determinar a capacidade de degradação de biodiesel por bactérias, previamente isoladas de tanques de armazenamento do próprio resíduo, os autores concluíram que o teste de atividade enzimática utilizando o Tween 20 demonstrou ser efetivo para a seleção de bactérias com capacidade de utilização de O&G. Nos testes de degradação de biodiesel, os isolados bacterianos selecionados foram capazes de utilizar este produto, sendo que, das 25 bactérias isoladas, 16 (64%) apresentaram atividade lipolítica.

Li et al. (2018), com o objetivo de isolar e caracterizar bactérias degradadoras de DQO de água residuária de abate de bovinos, obtiveram 6 bactérias com tal capacidade. Loperena et al. (2009), visando selecionar microrganismos nativos do tratamento aeróbio da água residuária de laticínios, obtiveram 41 culturas e, destas, 19 produziram lipase, 12 protease e 2 culturas produziram ambas as enzimas, sendo que 21 apresentavam alto potencial de atividade lipolítica e/ou atividade proteolítica.

Furini et al. (2018), buscando selecionar o melhor microrganismo lipolítico isolado de um sistema de tratamento biológico de efluentes de um hotel com potencial para emprego em processos biotecnológicos, encontraram gêneros de *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. No estudo de Lotrakul e Dharmstithi

(1997), os autores purificaram e caracterizaram a lipase de *Aeromonas sobria* LP004, isolada de leite cru.

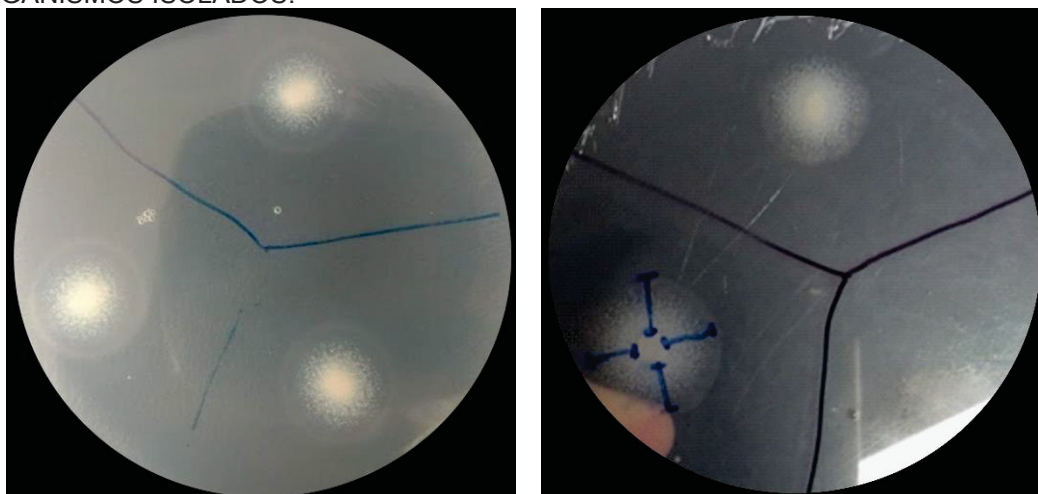
Ao mensurar os diâmetros médios dos halos de degradação e os diâmetros médios das colônias isoladas (Figura 2) foi possível calcular o IE de três bactérias, já que estas apresentaram os maiores halos. O maior valor (3,46) obtido foi referente a bactéria 1 (Tabela 11).

TABELA 11 - MÉDIA DO ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE) ENCONTRADO PARA CADA MICRORGANISMO, BASEADO NA RELAÇÃO ENTRE O DIÂMETRO DA COLÔNIA E O DIÂMETRO DO HALO.

Microrganismo	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo (cm)	IE
1	0,44±0,04	1,53±0,14	3,46±0,63
2	0,43±0,05	1,33±0,05	3,08±0,40
3	0,61±0,01	1,29±0,06	2,11±0,18

FONTE: O autor (2019).

FIGURA 2 – FOTOS ILUSTRATIVAS DOS HALOS DE DEGRADAÇÃO OBSERVADOS NOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.



FONTE: O autor (2019).

Padmapriya et al. (2011) ao isolar bactérias de vários ambientes ricos em O&G, como solo, fezes e leite, observaram que das 47 bactérias isoladas, 3 delas apresentaram as maiores formações de halo, com 1,5, 2,0 e 2,5 cm de diâmetro de halo. Silva et al. (2016), realizaram o estudo de isolamento de bactérias produtoras de lipase de efluente de planta piloto de biodiesel, e observaram IE de 1,03 a 2,37, próximo ao obtido no presente estudo. Alhamdani e Alkabbi. (2016) avaliaram a atividade lipolítica de oito microrganismos isolados de solo contaminado com óleo, e observaram IE de 2,9 e 2,8 para *Bacillus pumilus* cepa YHH-2 e *Bacillus pumilus* cepa NRC21.7, respectivamente.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Na Tabela 12 apresenta-se os dados do teste de Gram, catalase, bem como informações morfológicas de cada uma das três bactérias.

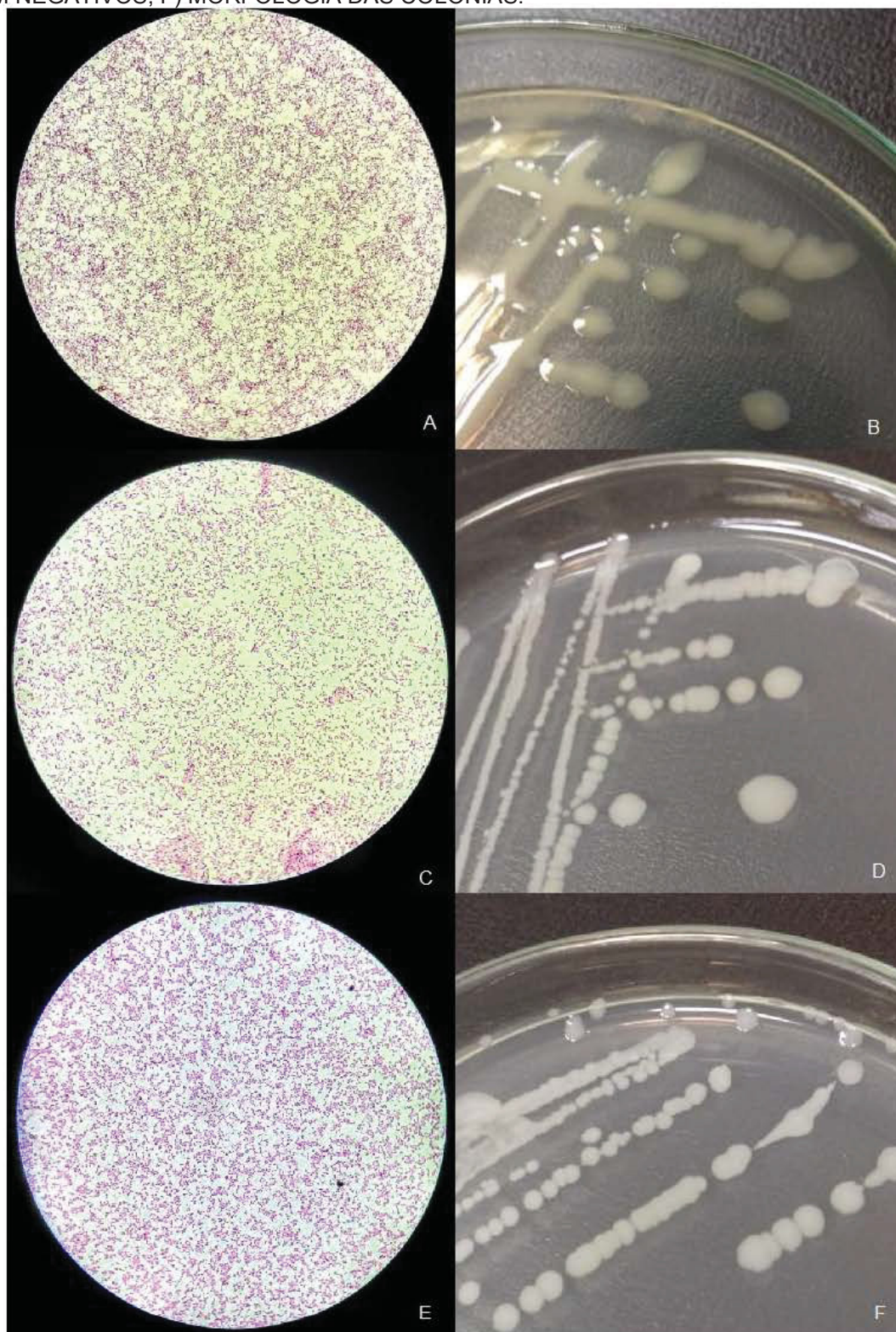
TABELA 12 - DADOS DE TESTE DE GRAM, CATALASE E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS.

Microrganismo	Gram	Catalase	Forma	Morfologia		
				Textura	Cor	Borda
1	Negativo	Positiva	Bacilos	Creмоса	Branca	Circular
2	Negativo	Positiva	Bacilos	Creмоса	Branca	Circular
3	Negativo	Positiva	Bacilos	Creмоса	Branca	Circular

FONTE: O autor (2019).

Pode ser observado na Tabela 12 e na Figura 3 que as três bactérias isoladas apresentaram Gram negativo e Catalase positiva. O resultado do teste de Gram está de acordo com a pesquisa de alguns autores, que afirmam que a maioria das bactérias lipolíticas encontradas na natureza são Gram-negativos (ROCHA et al., 2013; RAMNATH et al., 2016; FURINI et al., 2018).

FIGURA 3 – BACTÉRIA 1: A) BACILOS GRAM NEGATIVOS; B) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS. BACTÉRIA 2: C) BACILOS GRAM NEGATIVOS; D) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS. 3: E) BACILOS GRAM NEGATIVOS; F) MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS.



FONTE: O autor (2019).

Apesar de algumas bactérias produtoras de lipase ser Gram-positivas, como é o caso dos gêneros *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Clostridium* sp, sua atividade

lipolítica é menos expressiva que o das bactérias Gram-negativas (ROUSENAU e JAEGER, 2000). Oliveira, Hidalgo e Júnior (2014), isolaram e caracterizaram 23 microrganismos potencialmente produtores de lipase de uma estação de tratamento de esgoto, sendo a maioria das bactérias Gram Positivas (18), porém após a etapa de fermentação em meio líquido, os Gram Negativos (4) apresentaram as maiores atividades enzimáticas.

Quanto a morfologia todos os isolados apresentaram aspecto cremoso, coloração branca e borda circular (Figuras 3, 4 e 5).

As informações sobre as sequências obtidas por sequenciamento da região rDNA 16S do DNA dos isolados 1, 2 e 3 de estão apresentadas na Tabela 13.

TABELA 13 - RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO rDNA 16S DOS ISOLADOS 1, 2 e 3.

Bactéria	Espécie referência	% de ID	Número de acesso
1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,93	MF079290.1
2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99,86	MK089544.1
3	<i>Aeromonas spp.</i>	-	-

FONTE: O autor (2019).

Com relação aos isolados 1 e 2 foi possível a identificação a nível de espécie sendo identificadas como *Aeromonas hydrophyla*. Quanto a bactéria 3 (*Aeromonas spp.*), a identificação a nível de espécie não foi possível.

Os resultados de trabalhos baseados em amplificação e sequenciamento da região rDNA 16S têm demonstrado que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é ampla. Apesar do sequenciamento de rDNA 16S ser universalmente aceito como um padrão para identificação bacteriana, a técnica pode não ser útil para algumas espécies, pois podem apresentar sequências similares, até mesmo entre gêneros diferentes (MIGNARD e FLANDROIS, 2006).

Desta forma, uma alternativa para a identificação da espécie do isolado 3, poderia ser a utilização de *primers* espécie-específicos ou com a técnica de PCR-RFLP (PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism).

Aeromonas spp. são bactérias amplamente distribuídas, isoladas em amostras de várias origens, incluindo água (SCOARIS et al., 2008), peixes (ABD-ALLA, JASIM e HUSSEIN, 2014; YADAV et al., 2014), resíduos de lodo ativado (NEILSON, 1978; YASIN, SANCHEZ-TORRES e MAEDA, 2014), águas residuais (POFFE e BEECK, 1991), águas residuárias de abatedouro bovino (MARTINELLI et al.,

2010). A ocorrência de *Aeromonas* spp. foi avaliada no trabalho de BIZANI e BRANDELLI, (2001), em 70 amostras de água de um abatedouro bovino. *A. hydrophila* foi isolado de 11,4% das amostras de água de abastecimento e de 25,7% da água drenada das carcaças, enquanto *A. sobria* foi isolado de 5,7% das amostras da água fornecida.

5.6 PROCESSO FERMENTATIVO

Ao consultar a identidade dos isolados utilizando o número de acesso da Tabela 13, nota-se que as bactérias 1 e 2, podem diferir a nível de espécie com a bactéria 3, ou ainda as três bactérias podem variar quanto a linhagem, o que pode explicar as diferenças nos resultados de atividade lipolítica e dosagem proteica da Tabela 14.

Com relação a atividade enzimática e a dosagem proteica, também constatou-se que os maiores valores foram para a bactéria 1, com 2,46 U mL⁻¹ e 13,12 mg mL⁻¹ (Tabela 14), respectivamente, sendo, portanto, esta aplicada no pré-tratamento do efluente de abatedouro bovino.

TABELA 14- ATIVIDADE LIPOLÍTICA E DOSAGEM PROTEICA PARA CADA MICRORGANISMO.

Microrganismo	Atividade lipolítica (U mL ⁻¹)	Dosagem proteica (mg mL ⁻¹)
1	2,46±0,12	13,12±0,00
2	1,58±0,00	10,70 ±0,01
3	2,10±0,03	6,30±0,00

FONTE: O autor (2019).

No estudo de Peil et al. (2016), após isolar e caracterizar microrganismos produtores de lipase de efluentes provenientes de indústrias de matadouros e laticínios, os autores avaliaram a atividade enzimática das bactérias isoladas por meio do método titulométrico. Foi observado que a bactéria que apresentou atividade enzimática mais promissora foi a *Enterobacter aerogenes* (1,54 U ml⁻¹). Padmapriya et al. (2011) ao avaliar a dosagem proteica de lipase a partir do cultivo de *Lactobacillus* sp. filtrado, obtiveram o valor de 6,2 mg mL⁻¹. No estudo de Ekinci et al. (2016), os autores encontraram 2,01 U mL⁻¹ e 9,32 mg mL⁻¹ de atividade lipolítica e dosagem proteica, respectivamente para o microrganismo *G. stearothermophilus* cepa AH22.

Ao avaliar o valor da atividade lipolítica obtida no estudo de Neelambari et al.(2011), nota-se que a bactéria isolada no presente trabalho tem grande potencial,

visto que no estudo de Neelambari et al. (2011), os autores avaliaram a otimização e purificação de lipase de *Aeromonas hydrophila* e observaram atividade máxima de 15 U mL⁻¹, valor próximo ao obtido neste trabalho.

5.7 PRÉ-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO BOVINO

Visando acompanhar o processo de pré-tratamento do efluente em estudo, foram monitorados os parâmetros de atividade lipolítica, DQO, O&G, ácidos graxos livres e pH durante 72 h, sendo as análises realizadas a cada 24 h. Além disso, foi avaliado a concentração de proteína solúvel em 0 h e 72 h de reação. Com os resultados obtidos, foi possível observar que o tempo de reação de 72 h é o ideal para o pré-tratamento do efluente em estudo, visto que apresentou os maiores valores de remoção dos parâmetros avaliados. Períodos superiores podem ser inviáveis para aplicação industrial, principalmente pelo tamanho das unidades de tratamento. Desta forma, a análise estatística foi realizada com os resultados obtidos em 72 h de reação. O inóculo utilizado nos ensaios possuía microrganismos na faixa de 10¹⁰ células viáveis.

No Apêndice encontram-se as tabelas referente ao controle de cada um dos parâmetros monitorados.

5.7.6 Atividade lipolítica detectada no efluente de abatedouro bovino

Na Tabela 15 apresenta-se a matriz do delineamento experimental, com as variáveis nas suas formas codificadas e reais e os resultados obtidos para a atividade lipolítica no efluente, no decorrer dos ensaios realizados.

TABELA 15 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA.

Ensaio	Variáveis			Atividade lipolítica (U mL ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	0,27±0,02	0,20±0,12	0,70±0,07	0,82±0,05
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	0,08±0,00	0,20±0,04	0,60±0,02	0,53±0,05
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	0,05±0,00	0,02±0,05	0,58±0,00	0,82±0,05
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	0,00±0,02	0,07±0,00	0,48±0,00	0,65±0,02
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	0,20±0,04	0,16±0,00	0,53±0,10	0,77±0,00
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	0,35±0,14	0,20±0,04	0,63±0,00	0,73±0,05
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	0,00±0,02	0,05±0,02	0,68±0,10	0,82±0,00
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	0,00±0,00	0,15±0,02	0,53±0,15	0,68±0,00
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,18±0,02	0,10±0,05	0,15±0,00	0,40±0,05
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,13±0,02	0,30±0,05	0,28±0,02	0,50±0,05
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	0,02±0,02	0,10±0,00	0,77±0,05	0,73±0,05
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	0,05±0,05	0,51±0,02	0,58±0,00	0,73±0,05
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	0,15±0,05	0,15±0,00	0,30±0,00	0,30±0,05
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	0,10±0,00	0,08±0,02	0,10±0,00	0,40±0,05
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,29±0,05	0,51±0,10	1,06±0,05	1,30±0,00
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,19±0,15	0,46±0,05	1,21±0,00	1,40±0,00
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,24±0,00	0,31±0,00	0,97±0,05	1,35±0,05

FONTE: O autor (2019).

Como pode ser analisado na Tabela 15, logo no início da reação (0 h) foi apresentado atividade lipolítica, isso se deve possivelmente ao inóculo que continha certa quantidade de enzima quando inserido no sistema de pré-tratamento. No decorrer da reação, a atividade apresentou constante aumento, sendo observada a máxima atividade de 1,40 U mL⁻¹ em 72 h de reação, na condição de pH 7,5; temperatura de 35 °C e concentração de inóculo de 15% (Tabela 15).

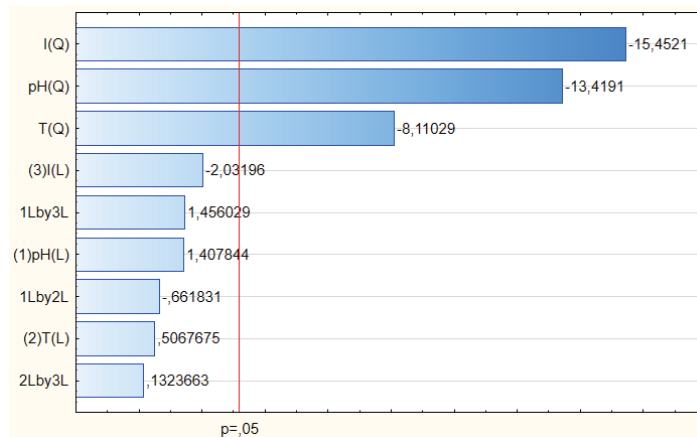
Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 15), ajustaram-se os dados para a obtenção de um modelo de regressão linear (eq. 9), relacionando a atividade lipolítica com os fatores que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. O modelo de regressão apresentou $R^2 = 0,8215$, significando que 82,15% da variação da atividade lipolítica é explicada pelo modelo.

$$\text{Atividade Lipolítica (U mL}^{-1}\text{)} = 1,302 - 0,250 \times \text{pH}^2 - 0,146 \times \text{T}^2 - 0,279 \times \text{i}^2 \quad (\text{Eq. 9})$$

Para verificar e confirmar a influência das variáveis independentes nos níveis e intervalos estudados em relação às variáveis respostas, os resultados foram analisados por meio de gráficos de pareto, ANOVA e superfícies de resposta. A influência das variáveis independentes sobre a atividade lipolítica, foi avaliada através

do gráfico de Pareto, presente na Figura 4. Os efeitos que estão à direita da linha vermelha (p -valor = 0,05) são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 4 - GRÁFICO DE PARETO PARA A ATIVIDADE LIPOLÍTICA.



FONTE: O autor (2019).

Analisando a Figura 4 constata-se que as variáveis concentração de inóculo, pH e temperatura em seus termos quadráticos influenciaram significativamente de forma negativa a atividade lipolítica em um nível de significância de 95%, desta forma com aumento do valor destas variáveis ocorre um decréscimo na atividade.

A partir da análise de variância do sistema, realizando-se o teste F, apresentado na Tabela 16, e comparando-se o valor de F calculado com o F tabelado é possível afirmar que o modelo proposto é válido e que os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais, caso $F_{calc} > F_{tab}$. A falta de ajuste baseia-se no erro puro, neste caso, se $F_{faltaajuste}$ for menor que F_{tab} a falta de ajuste não é significativa e a regressão linear proposta é adequada para ajustar os pontos experimentais de forma satisfatória.

TABELA 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A ATIVIDADE LIPOLÍTICA.

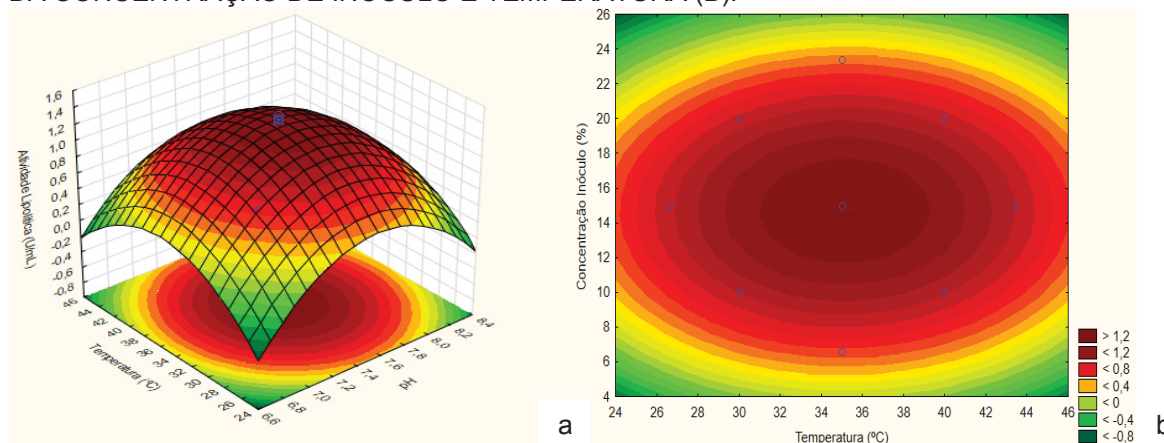
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{calc} /F _{tab}
Regressão	2,019	3	0,673	252,88	3,34	75,71
Resíduos	0,037	14	0,002			
Falta de ajuste	0,326	11	0,029	7,12	8,76	0,81
Erro puro	0,012	3	0,004			
Total	1,900	17				

FONTE: O autor (2019).

Observa-se na Tabela 16, que para a regressão o F_{cal} é maior que o F_{tab} e possui uma razão F_{cal}/F_{tab} maior que 1. Além disso, não foi observada significância na falta de ajuste, pois a razão do F calculado pelo F tabelado foi inferior a 1 (BARROS, SCARMINO e BRUNS, 2007). Ambos os resultados, indicam que o modelo se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo é válido.

A superfície de resposta apresentada na Figura 5a representa o modelo linear obtido para a atividade lipolítica em função da temperatura e do pH, e a Figura 5b representa o gráfico de contorno para atividade lipolítica em função da concentração de inóculo e temperatura.

FIGURA 5 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO PH (A). GRÁFICO DE CONTOURNO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (B).



FONTE: O autor (2019).

Nota-se que um pico foi obtido, que representa o ponto ótimo do processo, em temperatura, pH e concentração de inóculo de 35 °C, 7,5 e 15%, respectivamente.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram relatados por Suci, Arbianti e Hermansyah (2018) que avaliaram a atividade lipolítica de *Bacillus megaterium* pelo método titulométrico e obtiveram atividade de 3,30 U mL⁻¹ no cultivo de fermentação submersa na temperatura de 35 °C. Rocha et al. (2013) avaliando o pré-tratamento de água residuária de purificação de biodiesel em temperatura de 35 °C durante 120 h encontraram atividade lipolítica de 0,30 U mL⁻¹ utilizando o microrganismo isolado *Klebsilla oxytoca*. Shukla e Desai (2016) observaram a máxima atividade lipolítica do microrganismo *Pseudomonas* spp de 2,7 U mL⁻¹ em pH 7,5, temperatura de 30 °C após 48 a 72 h.

Grande parte das lipases possuem capacidade de atuar em ampla faixa de pH e temperatura (JAVED et al., 2018). O pH apresenta grande influência nas reações de hidrólise enzimática, pois pode acarretar alteração da sua estrutura molecular e conseqüentemente perda de atividade (MENDES et al., 2005; RAMANI et al., 2010; DORS et al., 2013). Segundo Borzani et al. (2001) a maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima, e a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, o qual é característico para cada enzima, mas, geralmente, ocorre em pH alcalino, conforme observado no trabalho de Mobarak-Qamsari et al. (2012), que estudaram a estabilidade da lipase extraída de *P. aeruginosa*, encontrando resultados melhores em pH 8,0. Nos estudos de Saadatullah et al. (2018) e Prasad e Manjunath (2012) foi encontrada máxima atividade lipolítica em pH 7,0, bem como no presente estudo.

Tripathi, Choudhary e Rawat (2018), avaliaram a atividade de lipase extracelular produzida por *Aeromonas hydrophila* isolada de um reservatório de água. Os autores observaram que a atividade enzimática em pH 5 a 6 foi quase insignificante, já em pH 7 a 9 ocorreu um notável aumento. Quanto a temperatura, foi observada boa atividade acima de 30 °C, apresentando máxima atividade em 40 °C. É importante ressaltar que o aumento da temperatura, promove o aumento da atividade enzimática, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. No entanto, temperaturas mais altas podem reduzir a estabilidade térmica da enzima, podendo haver desnaturação da mesma, ou seja, a perda de sua estrutura nativa, catalítica, por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional (BORZANI et al., 2001; GOMES et al., 2006; JI et al., 2010; PADILHA et al., 2012). Isso foi observado no trabalho de Chuang et al. (1997), avaliando a lipase extracelular (Lip) de *A. hydrophila*, em que após 30 min de incubação a 55 °C, apenas 20% da atividade enzimática foi mantida. Neste mesmo trabalho, foi encontrado maior atividade lipolítica em uma faixa de pH entre 7,5-8,0. No estudo de Neelambari et al. (2011), a máxima atividade lipolítica de *Aeromonas hydrophila* foi observada em 37 °C.

A atividade lipolítica foi detectada na bactéria do gênero *Aeromonas* no estudo de Serikovna et al. (2013), que teve como objetivo encontrar microrganismos produtores de lipase de águas residuais de abatedouro, de esgoto urbano, bem como solo de uma planta de laticínios, visando posterior aplicação no tratamento biológico de efluentes industriais contendo O&G. Dentre os microrganismos isolados, os

autores observaram que as estirpes *Pseudomonas aeruginosa* G23, *Aeromonas punctata* G30 e *P. aeruginosa* Zb32, apresentaram maior atividade lipolítica, além de apresentarem redução nas frações de gordura de $88 \pm 4\%$, $60 \pm 8\%$ e $52 \pm 6\%$, respectivamente, em uma solução de sebo bovino.

5.7.7 Demanda Química de Oxigênio

Na Tabela 17 observa-se a matriz do delineamento experimental, com os níveis de cada variável (pH, temperatura e concentração de inóculo) e os resultados obtidos para concentração de DQO, no decorrer dos ensaios realizados.

TABELA 17 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE DQO.

Ensaio	Variáveis			DQO (mg L ⁻¹)				Eficiência (%)
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h	
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	8486,7±150,0	7786,7±183,3	8070,0±200,0	5836,7±166,7	31,23
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	8086,7±66,7	7886,7±250,0	7003,3±0,0	6786,7±116,7	16,08
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	5186,7±400,0	4210,0±150,0	3510,0±16,7	2926,7±0,0	43,57
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	4320,0±133,3	3826,7±0,0	3343,3±83,3	2943,3±16,7	31,87
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	8903,3±33,3	9003,3±33,3	9720,0±150,0	4860,0±66,7	45,41
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	9070,0±33,3	8870,0±233,3	5986,7±83,3	5126,7±66,7	43,48
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	5953,3±33,3	3776,7±50,0	3210,0±83,3	1943,3±83,3	67,36
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	5153,3±233,3	3543,3±83,3	3626,7±0,0	2293,3±0,0	55,50
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	8760,0±0,0	8650,0±16,7	8516,7±16,7	8250,0±16,7	5,82
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	8826,7±0,0	8600,0±33,3	8983,3±83,3	8816,7±16,7	0,11
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	7960,0±33,3	7926,7±0,0	7760,0±33,3	6126,7±0,0	23,03
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	9143,3±50,0	8360,0±33,3	8293,3±0,0	8160,0±33,3	10,75
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	8976,7±16,7	8883,3±16,7	8883,3±16,7	8916,7±50,0	0,67
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	9310,0±16,7	8850,0±216,7	9116,7±216,7	9083,3±116,7	2,43
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	8660,0±33,3	8510,0±50,0	6643,3±83,3	5316,7±16,7	38,61
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	8760,0±0,0	8826,7±66,7	4476,7±50,0	5216,7±50,0	40,45
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	8243,3±50,0	8776,7±16,7	7060,0±133,3	4816,7±16,7	41,57

FONTE: O autor (2019).

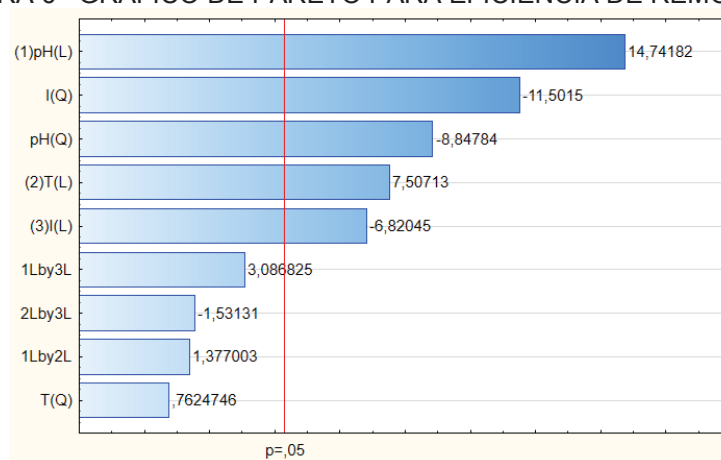
Na Tabela 17 é possível observar oscilações das concentrações iniciais de DQO, que podem estar relacionadas com os valores de inóculos adicionados. Nota-se que a menor concentração de DQO ocorreu no ensaio 7 que corresponde ao pH 8,0, temperatura de 40 °C e concentração de inóculo de 10%, alcançando uma média de 1943,3 mg L⁻¹ ou remoção de 67,4%. Observa-se na Tabela 16, que em maior porcentagem de inóculo, a redução foi menor, corroborando com o trabalho de Sonune e Garode (2018), que afirmaram que tal fato pode ter ocorrido devido à baixa disponibilidade de nutrientes e alta taxa de mortalidade dos microrganismos.

Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 17), ajustaram-se os dados para a obtenção de um modelo de regressão linear (eq. 10), relacionando a eficiência de remoção de DQO com os fatores que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. O modelo de regressão, apresentou R² = 0,1686, o que representa que 16,86% da variação da eficiência de remoção de DQO (%) é explicada pelo modelo apresentado.

$$\text{Remoção de DQO (\%)} = 36,39 + 6,09 \times \text{pH} - 4,25 \times \text{pH}^2 + 3,04 \times T - 2,78 \times I - 5,09 \times I^2 \quad (\text{Eq. 10})$$

Com base nos dados apresentados na Tabela 17, elaborou-se o gráfico de Pareto para avaliação da significância da temperatura, concentração de inóculo e pH em relação a remoção de DQO (Figura 6), para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 6– GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE DQO.



FONTE: O autor (2019).

A partir dos níveis testados, é possível identificar na Figura 6, que as variáveis pH em seus termos linear e quadrática, temperatura em seu termo linear e concentração de inóculo linear e quadrática influenciaram significativamente a eficiência de remoção de DQO em um nível de significância de 95%.

Observa-se na Tabela 18, que para a regressão $F_{cal} > F_{tab}$ e tem-se uma razão F_{cal}/F_{tab} maior que 1. Entretanto, verifica-se que a falta de ajuste é significativa, pois F_{calc} é consideravelmente maior que F_{tab} . Ambos os resultados, além do coeficiente de determinação do modelo baixo ($R^2 = 0,167$), indicam que o modelo não se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo não é válido.

TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE REMOÇÃO DE DQO.

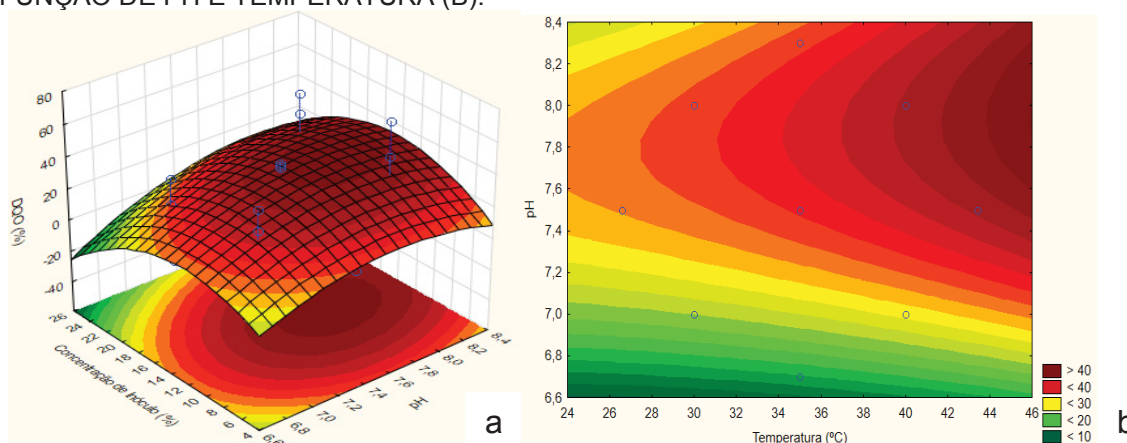
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{cal} /F _{tab}
Regressão	1187,50	5	237,500	81,36	3,20	25,43
Resíduos	32,108	11	2,918			
Falta de ajuste	5476,98	9	608,553	271,98	19,38	14,03
Erro puro	4,475	2	2,237			
Total	6673,481	16				

FONTE: O autor (2019).

Entretanto, apesar da não validação do modelo, é possível avaliar a influência das variáveis independentes sobre a eficiência de remoção de DQO a partir das superfícies de resposta, indicando a direção a ser tomada numa próxima etapa.

Na Figura 9 é apresentada a superfície de resposta obtida para a remoção de DQO em função da concentração de inóculo e do pH (Figura 7a), e o gráfico de contorno em função do pH e da temperatura (Figura 7b).

FIGURA 7 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA REMOÇÃO DE DQO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INOCULO E PH (A). GRÁFICO DE CONTOURNO PARA REMOÇÃO DE DQO EM FUNÇÃO DE PH E TEMPERATURA (B).



FONTE: O autor (2019).

Como pode ser observado, o pH em torno do intervalo de 7,5 a 8,0, concentração de inóculo em torno de 10 a 20% e temperaturas mais elevadas podem ser utilizadas para obter maior eficiência na remoção de DQO, afirmações estas certificadas pelos ensaios 7 (pH 8,0, 40 °C, 10% de inóculo e 67% de remoção) e 8 (pH 8,0, 40 °C, 20% de inóculo e 55% de remoção).

Na Tabela 19 estão apresentados resultados encontrados na literatura de remoção de DQO de diferentes efluentes industriais.

TABELA 19 – TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTE A REMOÇÃO DE DQO COMPARADOS AO OBTIDO NESTE ESTUDO.

Referência	Efluente	Inóculo	Condição	Tempo	DQO (%)
Vida, Akbar e Zahra (2007)	Laticínio	Isolado bacteriano BP3	32 °C, pH 11, 150 rpm	720 h	84%
Rigo et al. (2008)	Indústria de carne bovina e suína	Lipase de <i>Penicillium restrictum</i>	Pré-tratamento com 0,1% de inóculo e posterior biodigestão, 35 °C, pH 7	96 h	65%
Verma et al. (2012)	Águas residuais contaminadas com petróleo	Isolado de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10% de inóculo, 35 °C, 180 rpm	168 h	86,4%
Sreemoyee e Priti (2013)	Produtos lácteos	Cultura de <i>Neisseria sp.</i>	1% de inóculo, 24 °C, pH do efluente 8,5	120 h	67,1%
Dors et al. (2013)	Avícola	Lipase pancreática porcina (PPL)	3,0 g/L de inóculo, 35 °C, pH 8, 100 rpm	Pré-tratamento e posterior biodegradação anaeróbica por 30 dias	92%
Porwal, Mane e Velhal (2015)	Laticínio	Cultura mista (Isolado bacteriano e fúngico)	10 mL de inóculo em 1L de efluente, temperatura ambiente	48 h com aeração, 1 h de repouso e filtração	86,0%
Priyadharshini e Kumar (2016)	Laticínio	Isolado de <i>Bacillus sp.</i>	30 °C, 120 rpm	120 h	57%
Al-Wasify, Ali e Hamed (2017)	Laticínio	Isolado bacteriano	10 mL de inóculo em 1,5L de efluente, temperatura ambiente	48 h com aeração e posterior filtração	78,5%
Affes et al. (2017)	Avícola	Cultura de <i>Staphylococcus xylosus</i>	10% de inóculo, 37 °C, pH 7	144 h e posterior codigestão anaeróbica por 30 dias	72%
Sonune e Garode (2018)	Água residuária municipal	Isolado de <i>Bacillus licheniformis</i>	10% de inóculo, 37 °C, 120 rpm, pH 6,8	72 h	25%
Neste estudo	Abatedouro bovino	Isolado de <i>Aeromonas hydrophila</i>	10% de inóculo, 40 °C, pH 8	72 h	67,4%

FONTE: O autor (2019).

Segundo Sonune e Garode, (2018), o teste de DQO é um método rápido para estimar a matéria orgânica presente em amostras de águas residuais. Verifica-se que o resultado de remoção de DQO obtido para este estudo encontra-se dentro do intervalo apresentado na literatura para efluentes industriais. Além disso, quando

comparado a outros trabalhos, este estudo mostrou-se bastante promissor; como por exemplo, comparado aos estudos de Priyadharshini e Kumar (2016), e Sonune e Garode (2018), que observaram 57% e 25% de remoção de DQO, em um tempo maior e igual de reação, respectivamente. Como também, em relação ao trabalho de Rigo et al. (2008), em que ao avaliar o pré-tratamento e posterior biodigestão anaeróbica de efluentes de indústria de carne bovina e suína, encontraram 65% de remoção de DQO, valor inferior ao obtido para este estudo, em que apenas foi realizado o pré-tratamento do efluente. No entanto, esta discrepância pode ter sido causada devido ao uso de 10% de inóculo neste estudo e 0,1% de inóculo no trabalho supracitado.

Quanto as diferenças observadas neste estudo e os valores obtidos pelos autores da literatura podem ter vários motivos. O tempo de reação pode ter sido um deles, como observado nos estudos de Vida, Akbar e Zahra (2007) e Verma et al. (2012), os efluentes foram pré-tratados durante 30 e 7 dias, respectivamente, podendo explicar os resultados superiores de remoção de DQO. Outro motivo pode ter sido o uso de posterior filtração ou biodegradação anaeróbica, realizados respectivamente nos trabalhos de Al-Wasify, Ali e Hamed (2017) e Dors et al. (2013).

5.7.8 Óleos e graxas

Segundo Masse, Massé e Kennedy (2003), os lipídeos representam 40% da DQO total dos efluentes de abatedouros. A remoção de O&G de águas residuais é extremamente importante para garantir que estas águas sejam descartadas de forma eficiente e econômica evitando obstrução de tubulações de esgotos e problemas nas estações de tratamento de efluentes (TZIRITA, PAPANIKOLAOU e QUILTY, 2019).

Os resultados dos efeitos do pH, temperatura e concentração de inóculo (variáveis independentes) em relação a concentração de O&G (variável resposta), são apresentadas na Tabela 20.

TABELA 20 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE O&G.

Ensaio	Variáveis			Óleos e Graxas (mg L ⁻¹)				Eficiência (%)
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h	
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	3506,7±0,0	1660,0±126,7	1973,3±66,7	1060,0±60,0	58,49
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	3186,7±13,3	1760,0±66,7	2186,7±13,3	2046,7±86,7	19,84
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	2313,3±100,0	1400,0±173,3	1720,0±40,0	1906,7±420,0	25,33
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	1666,7±13,3	1106,7±66,7	1846,7±33,3	1213,3±53,3	52,48
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	2733,3±40,0	2646,7±180,0	2946,7±13,3	1573,3±280,0	38,38
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	2846,7±6,7	2820,0±220,0	2480,0±146,7	2506,7±213,3	1,83
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	2140,0±6,7	1640,0±53,3	1980,0±20,0	1766,7±100,0	30,81
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	1526,7±6,7	1440,0±26,7	880,0±13,3	1593,3±6,7	37,60
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	2413,3±160,0	2253,3±200,0	1073,3±100,0	1573,3±120,0	38,38
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	2180,0±113,3	2073,3±46,7	2053,3±13,3	1706,7±66,7	33,16
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	2993,3±86,7	2486,7±6,7	2613,3±53,3	2420,0±73,3	5,22
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	2746,7±80,0	2873,3±86,7	2240,0±133,3	1760,0±26,7	31,07
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	2606,7±260,0	2233,3±60,0	1693,3±173,3	1173,3±80,0	54,05
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	3360,0±93,3	2593,3±100,0	1886,7±73,3	2013,3±93,3	21,15
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	3346,7±93,3	2406,7±86,7	2226,7±13,3	1446,7±46,7	43,34
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	2760,0±160,0	2460,0±6,7	1960,0±40,0	1760,0±26,7	31,07
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	3586,7±93,3	2593,3±86,7	2393,3±33,3	1746,7±66,7	31,59

FONTE: O autor (2019).

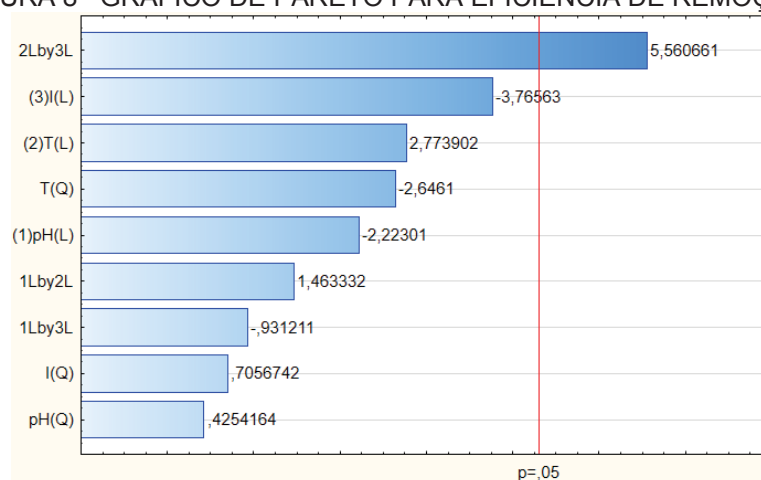
A Tabela 20 permite observar variações no teor de O&G, com remoção mais acentuada em 72 h, em torno de 60%. Tal observação também foi verificada por Rocha et al. (2013) utilizando a mesma metodologia de análise. Este fato pode ter sido causado pela baixa reprodutibilidade dos resultados pela metodologia utilizada. Observa-se na Tabela 20, que o ensaio 1 foi o que proporcionou melhores reduções da concentração de O&G, sendo conduzido em pH 7,0, temperatura de 30 °C e concentração de inóculo de 10%, alcançando uma média de 1060 mg L⁻¹ com remoção de 58,5%.

Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 20), ajustaram-se os dados para a obtenção de um modelo de regressão linear (eq.11), relacionando a eficiência de remoção de O&G com os fatores que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de correlação (R²) foi de 0,9015, indicando que o modelo explicou 90,15% da variação dos dados observados.

$$\text{Remoção de O\&G (\%)} = 35,047 + 13,642 \times T_x \quad (\text{Eq. 11})$$

A estimativa dos efeitos das variáveis independentes em relação a eficiência de remoção de O&G é ilustrada no gráfico de Pareto (Figura 8). Os efeitos que estão à direita da linha vermelha (p-valor =0,05) são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 8– GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G.



FONTE: O autor (2019).

A Figura 8 indica que nos ensaios de remoção de O&G, a interação entre as variáveis temperatura e concentração de inóculo influenciaram significativamente e de

forma positiva a eficiência de remoção de O&G em um nível de significância de 95%, ou seja, aumentando o valor destes parâmetros maiores remoções de O&G podem ser obtidos. Como o pH não afetou significativamente a remoção de O&G, este pode ser alterado de acordo com a aplicação.

Observa-se na Tabela 21, que para a regressão $F_{cal} > F_{tab}$ e tem-se uma razão F_{cal}/F_{tab} maior que 1. Além disso, não foi observada significância na falta de ajuste, pois a razão do F calculado pelo F tabelado foi inferior a 1 (BARROS, SCARMINO e BRUNS, 2007). Ambos os resultados, indicam que o modelo se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo é válido.

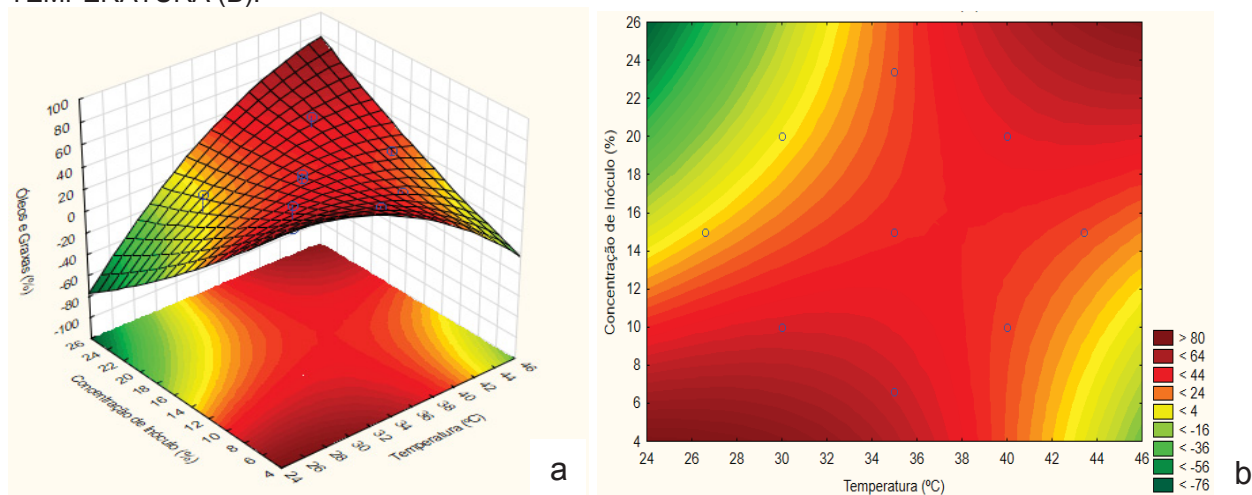
TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE REMOÇÃO DE O&G.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{cal} /F _{tab}
Regressão	1488,898	1	1488,898	12,37	4,54	2,72
Resíduos	1805,960	15	120,397			
Falta de ajuste	276,446	13	21,265	0,44	19,42	0,02
Erro puro	96,304	2	48,159			
Total	3784,950	16	236,559			

FONTE: O autor (2019).

A superfície de resposta apresentada na Figura 9a representa o modelo linear obtido para a eficiência de remoção de O&G em função da concentração de inóculo e da temperatura, e a Figura 9b representa o gráfico de contorno para a eficiência de remoção de O&G em função da concentração de inóculo e da temperatura.

FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (A). GRÁFICO DE CONTOURNO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE O&G EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (B).



FONTE: O autor (2019).

A condução do processo de pré-tratamento do efluente de abatedouro de bovinos nos extremos de maiores e menores condições de temperatura e concentração de inóculo proporcionam as máximas remoções de O&G, enquanto que o pH não afetou significativamente a remoção de O&G. Fatos estes também observados no ensaio 1 conduzidos em menor concentração de inóculo e temperatura (10%, 30 °C, 59% de remoção) e no ensaio 4 conduzidos em maior concentração de inóculo e temperatura (20%, 40 °C, 53% de remoção).

A biodegradação dos lipídeos é limitada principalmente por suas propriedades físico-química defavoráveis, por exemplo, são insolúveis em água. Desta forma, temperaturas mais elevadas no tratamento de efluentes com O&G se mostra vantajoso, visto que os coeficientes de difusão e solubilização de lipídeos aumentam com a elevação da temperatura e com isso esses compostos tornam-se mais acessíveis aos microrganismos e suas enzimas (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; CHIPASA e MEDRZYCKA, 2006). Quanto a concentração de inóculo, segundo Masse et al. (2001), embora uma quantidade elevada maximize a hidrólise de óleo e gordura, pode causar a diminuição da biodegradação, provavelmente devido à inibição causada pelo excesso de ácidos graxos livres. Deste modo, ao levar em conta o custo-benefício, o ideal seria a utilização de menor temperatura e concentração de inóculo em torno de 30 °C e 10%, respectivamente.

Na Tabela 22 estão apresentados resultados encontrados na literatura de remoção de O&G de diferentes efluentes industriais.

TABELA 22 – TRABALHOS DA LITERATURA REFERENTE A REMOÇÃO DE O&G COMPARADOS AO OBTIDO NESTE ESTUDO.

Referência	Efluente	Inóculo	Condição	Tempo (h)	O&G (%)
Massé et al. (2003)	Efluente de matadouros com partículas de gordura de porco	Lipase pancreática 250 comercial (PL-250)	250 mg/L de PL-250, 25 °C	5,5 h	35%
Mendes, Pereira e Castro (2006)	Águas residuárias lácteas	Lipase de pâncreas suíno	0,5% de enzima, 37 °C, pH 8	24 h	40%
Rocha et al. (2013)	Água residuária de purificação de biodiesel	Inóculo de <i>Klebsilla oxytoca</i>	35 °C	48 h	80%
Porwal et al. (2015)	Laticínio	Cultura mista (isolado de levedura e bacteriano)	10 mL de inóculo em 1L de efluente, temperatura ambiente	48h com aeração, 1 h de repouso	59,1%
Krishnan e Valsa (2015)	Laticínio	Consórcio (isolado de <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus simplex</i> , <i>Trichococcus</i> sp.)	10% de inóculo, 30 °C, 200	216 h	88,5%
Al-Wasify, Ali e Hamed (2017)	Laticínio	Isolado bacteriano	10 mL de inóculo em 1,5L de efluente, temperatura ambiente	48 h com aeração e posterior filtração	97,9%
Damasceno et al. (2018)	Água residual de matadouro de aves	Enzima do fungo <i>Penicillium brevicompactuum</i> (SEP) e biossurfactante de <i>P.aeruginosa</i>	0,5% de SEP e 27 mg/L de biossurfactante, 30 °C, pH 7	4h e posterior tratamento anaeróbico por 187 dias	96%
Neste estudo	Abatedouro bovino	Isolado de <i>Aeromonas hydrophila</i>	10% de inóculo, 30 °C, pH 7	72 h	58,5%

FONTE: O autor (2019).

A remoção de O&G obtida no presente estudo encontra-se dentro do intervalo apresentado na literatura para efluentes industriais (Tabela 22). Quanto as diferenças observadas neste estudo e os valores obtidos pelos autores em questão podem ser vários motivos. No estudo de Al-Wasify, Ali e Hamed (2017) o efluente foi submetido a filtração após o pré-tratamento, podendo explicar a alta eficiência de remoção. Nos trabalhos de Massé et al. (2003) e Mendes, Pereira e Castro (2006), baixos valores de remoção podem ter sido obtidos pelos menores tempos de reação utilizado.

Quanto as diferenças observadas entre o presente estudo e a pesquisa de Krishnan e Valsa (2015), podem ser explicadas pelo fato do uso de uma cultura mista de microrganismos por estes autores. Nisola et al. (2009), Loperena et al. (2009) e Tang et al. (2012) relataram que uma combinação de bactérias Gram-

positivas e Gram-negativas poderia ser muito eficaz para a degradação de óleo e gordura e sugeriram que isso poderia ser atribuído a uma atividade cooperativa entre elas.

No trabalho de Damasceno et al. (2018), a elevada remoção de O&G observada pode ser explicada pelo uso de enzima juntamente com biossurfactante como inóculo. O biossurfactante pode facilitar a biodegradação do efluente pela dissolução de O&G (NAKHLA et al., 2003).

Outro importante fator relacionado a remoção de O&G diz respeito a ativação da enzima lipase. Segundo Mendes et al. (2005), a ativação da lipase depende da formação de uma interface lipídeo/água e da adsorção da enzima nessa interface. Além disso, o excesso de O&G, em especial ácidos graxos de cadeia longa, podem gerar efeitos inibidores no crescimento dos microrganismos anaeróbios e na produção de enzima, desestabilizando o sistema de pré-tratamento (VALENTE et al., 2010).

5.7.9 Ácidos Graxos Livres

Na Tabela 23 apresenta-se a matriz do delineamento experimental, com as variáveis nas suas formas codificadas e reais, e os resultados obtidos para a concentração de ácidos graxos livres no efluente, no decorrer dos ensaios realizados.

TABELA 23 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E CODIFICADOS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.

Ensaio	Variáveis			Ácidos Graxos Livres ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)			
	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	9,80±0,00	15,19±1,47	25,52±0,00	29,58±1,74
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	7,84±0,00	11,76±0,00	21,46±0,49	24,94±0,58
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	6,96±0,00	8,12±0,98	20,88±0,00	20,30±0,41
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	5,80±0,00	9,57±0,24	20,30±0,49	22,04±0,98
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	8,33±0,49	15,19±0,49	22,62±1,47	26,10±0,58
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	8,33±0,49	16,17±0,49	26,10±0,49	27,84±0,00
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	6,96±0,00	8,12±0,00	18,56±0,00	21,46±0,40
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	6,67±0,24	8,12±0,00	19,43±0,24	18,27±0,45
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	11,40±0,60	13,80±0,60	19,50±0,30	31,20±1,20
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	12,60±0,60	14,10±0,30	23,40±0,60	35,40±0,60
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	12,18±0,49	21,46±0,49	28,13±0,24	33,06±0,87
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	11,60±0,00	22,91±0,24	29,00±0,00	31,90±0,31
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	14,40±0,00	18,60±0,60	21,00±0,60	26,40±0,00
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	11,40±0,60	14,40±0,00	19,20±0,00	32,40±0,00
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	11,60±0,00	17,98±0,49	30,74±0,49	35,40±0,60
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	10,44±0,00	18,56±0,98	30,16±0,98	36,00±1,20
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	11,02±0,00	17,98±0,49	30,16±0,00	34,20±0,60

FONTE: O autor (2019).

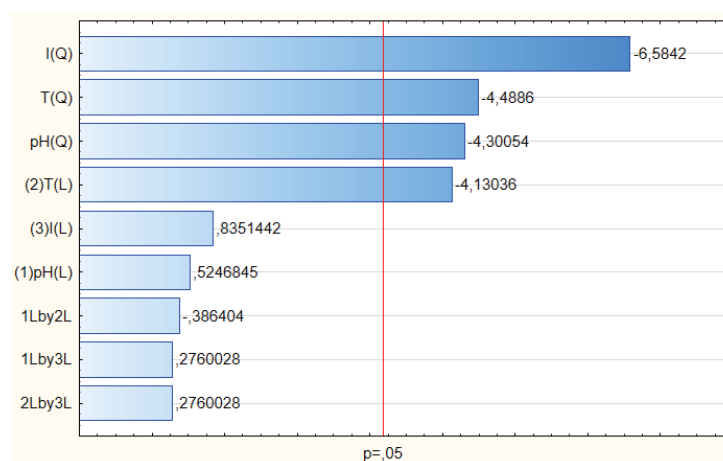
Observa-se na Tabela 23 que o melhor resultado obtido ocorreu no ensaio 16, que corresponde a condição do ponto central, com pH 7,5, temperatura de 35 °C e concentração de inóculo de 15%, alcançando uma concentração de ácidos graxos livres média de 36,0 $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 23), ajustaram-se os dados para a obtenção de um modelo de regressão linear (eq. 12), relacionando a concentração de ácidos graxos livres com os fatores que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. O modelo de regressão (eq. 12), apresentou $R^2 = 0,5097$, significando que 50,97% da variação da concentração de ácidos graxos livres ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) é explicada pelo modelo.

$$\text{Concentração de ácidos graxos livres } (\mu\text{mol mL}^{-1}) = 34,931 - 2,422 \times \text{pH}^2 - 2,077 \times T - 2,337 \times T^2 - 3,429 I^2 \quad (\text{Eq. 12})$$

A estimativa dos efeitos das variáveis independentes em relação a concentração de ácidos graxos livres é apresentada no gráfico de Pareto (Figura 10). Os efeitos que estão à direita da linha vermelha ($p\text{-valor} = 0,05$) são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 10 – GRÁFICO DE PARETO PARA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.



FONTE: O autor (2019).

Na Figura 10 indica-se que nos ensaios, avaliando a concentração de ácidos graxos livres, o termo linear da concentração de inóculo, os termos linear e quadrático da temperatura, bem como o pH em seu termo quadrático influenciaram

significativamente de forma negativa a concentração de ácidos graxos livres em um nível de significância de 95%.

Observa-se na Tabela 24, que para a regressão $F_{cal} > F_{tab}$ e tem-se uma razão F_{cal}/F_{tab} maior que 1. Além disso, não foi observada significância na falta de ajuste, pois a razão do F calculado pelo F tabelado foi inferior a 1 (BARROS, SCARMINO e BRUNS, 2007). Ambos os resultados, indicam que o modelo se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo é válido.

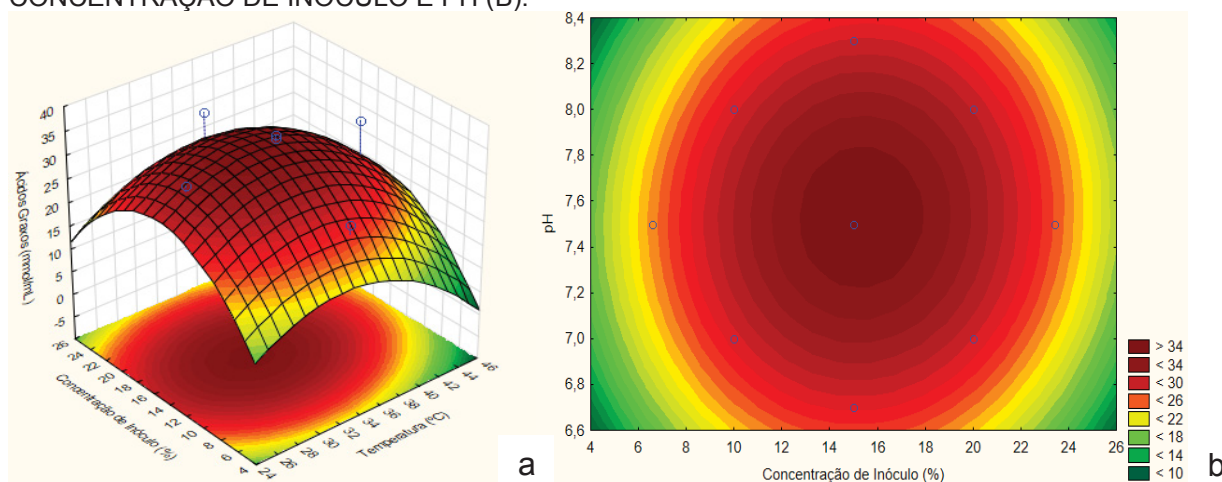
TABELA 24 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA O MODELO DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{cal} (95%)	F _{tab} (95%)	F _{cal} /F _{tab}
Regressão	341,735	4	85,434	252,60	3,18	79,46
Resíduos	4,397	13	0,338			
Falta de ajuste	252,352	10	25,235	7,31	8,78	0,83
Erro puro	10,350	3	3,450			
Total	535,780	17	31,516			

FONTE: O autor (2019).

A superfície de resposta apresentada na Figura 11a representa o modelo linear obtido para a concentração de ácidos graxos livres em função da concentração de inóculo e da temperatura, e a Figura 11b representa o gráfico de contorno para a concentração de ácidos graxos livres em função da concentração de inóculo e do pH.

FIGURA 11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E PH (B).



FONTE: O autor (2019).

Na superfície de resposta e no gráfico de contorno nota-se que um pico foi observado, que representa o ponto ótimo do processo, correspondendo as condições do ponto central do planejamento (35 °C, pH 7,5 e 15% de inóculo).

No estudo de Kempka et al. (2018), ao avaliar as melhores condições para hidrólise de lipídeos presentes em efluente de frigorífico de suínos, comparando uma fosfolipase comercial livre e uma imobilizada, também observaram a maximização da liberação de ácidos graxos para enzima livre e imobilizada nas condições experimentais do ponto central do planejamento que corresponderam a temperatura de 36 °C, pH 8,5 e 1,1% de enzima, com valor chegando a 34 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ de ácidos graxos para a fosfolipase imobilizada, valor este próximo ao obtido no presente estudo.

Mobarak-Qamsari et al. (2012) estudaram o efeito do pré-tratamento de efluentes lácteos sintéticos com teor de gordura total de 1000 mg/L utilizando extrato enzimático de *Pseudomonas aeruginosa*, e observaram que na condição de otimização do pré-tratamento (45 °C, 10% de inóculo v/v, 48 h) em torno de 20 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ de ácidos graxos livres foi obtido. Rigo et al. (2008), encontraram as melhores conversões a 45 °C após 24 h (39,5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) usando 5% da enzima comercial Lipolase 100T para a hidrólise de águas residuais de indústria de processamento de carne suína, valor este próximo ao obtido neste estudo em 72 h, isto sugere que o inóculo utilizado apresenta grande potencial, visto que no estudo de Rigo et al.(2008), os autores utilizaram uma enzima comercial.

Kempka, Celuppi e Revello (2013) obtiveram valores de ácidos graxos liberados próximos a 32 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ utilizando lipase, e observaram 90% de remoção de DQO no tratamento biológico subsequente. Leal et al. (2006), ao estudarem a hidrólise de efluente de laticínio contendo 1000 mg L⁻¹ de O&G utilizando lipase, testaram três diferentes temperaturas (25, 35 e 45 °C), otimizando o processo de hidrólise em 35 °C, chegando a valores próximos a 10 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ de ácidos graxos livres em 24 h de reação.

Segundo trabalhos da literatura, a biodegradabilidade de ácidos graxos aumenta com o decréscimo do comprimento da cadeia de carbono e com o aumento do grau de insaturação das mesmas, uma vez que ácidos graxos saturados são menos solúveis do que os ácidos graxos insaturados, eles são menos acessíveis às células microbianas e, portanto, são degradados a uma taxa mais lenta (BROOKSBANK, LATCHFORD e MUDGE, 2007; SAYGÜN, ŞAHIN-YEŞİLÇUBUK e

ARAN, 2014). No entanto, já foi relatado que bactérias Gram-negativas podem também utilizar ácidos graxos de cadeia longa como fonte de carbono. Eles são degradados a ácidos graxos livres e glicerol, que posteriormente durante a via de β -oxidação, podem ser hidrolisados em acetil-coA e acetato, que pode ser oxidado a dióxido de carbono e água (RATLEDGE, 1992; TANG et al., 2012; TZIRITA, PAPANIKOLAOU e QUILTY, 2018).

Valente et al. (2010) estudaram a produção de ácidos graxos livres durante a hidrólise de gorduras presentes no efluente de indústria de pescado (1500 mg L⁻¹ de O&G, 30 °C) com diferentes teores de preparados enzimáticos sólidos (PES 0,2,0,5 e 1,0% m/v). Foi observada pequena diferença entre os ácidos graxos livres no experimento controle (10 $\mu\text{mol mL}^{-1}$, sem adição de PES) e naqueles com efluente contendo a enzima lipase (11 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ com 1% de PES). Segundo os autores, os baixos valores de produção de ácidos graxos no meio reacional se devem ao fato de haver produção e consumo simultâneos. Os microrganismos adicionados no efluente, podem utilizar os ácidos graxos liberados na hidrólise como substrato, reduzindo sua concentração no meio (LEAL et al., 2002).

5.7.10 Proteína Solúvel

Analisando os resultados obtidos de DQO foi observado que a maior eficiência de remoção nos tratamentos foi no ensaio 7 de 67%. Ao considerar que a DQO abrange a matéria orgânica do efluente, sendo esta composta por O&G, proteína e carboidrato (PEREIRA et al., 2006; BUSTILLO-LECOMPTE e MEHRVAR, 2015), optou-se por investigar se ocorreu remoção de proteína do efluente.

Na Tabela 25 observa-se a matriz do delineamento experimental, com os níveis de cada variável (pH, temperatura e concentração de inóculo) e os resultados obtidos para concentração de proteína solúvel, nos tempos de 0 h e 72 h.

TABELA 25 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E CODIFICADOS E RESPOSTA QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL E EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO.

Ensaio	Variáveis			Proteína Solúvel (mg L ⁻¹)		Remoção (%)
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	72 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	4359,11±57,51	266,58±5,11	93,88
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	3824,49±69,48	294,27±7,90	92,31
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	3445,37±12,78	273,61±1,92	92,06
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	2883,07±20,87	166,90±7,30	94,21
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	4065,18±31,95	264,66±1,92	93,49
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	3656,23±19,17	252,52±2,56	93,09
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	3215,34±76,68	173,93±1,92	94,59
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	1801,06±12,05	148,58±1,59	91,75
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	4212,14±36,15	196,29±2,761	95,34
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	4339,94±12,78	255,72±0,64	94,11
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	4461,34±6,39	310,67±4,47	93,04
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	4026,84±57,51	476,81±4,47	88,16
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	4310,12±6,02	235,48±4,82	94,54
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	3534,82±25,56	258,91±3,76	92,68
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	4454,95±38,34	286,60±2,41	93,57
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	4435,78±6,39	293,42±1,28	93,39
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	4525,24±57,51	305,56±0,64	93,25

FONTE: O autor (2019).

Observa-se na Tabela 25 que elevada remoção de proteína solúvel foi obtida. A eficiência de remoção variou de 91,7 a 95,3%. O melhor resultado obtido ocorreu no ensaio 9, correspondendo as condições de pH 6,7, temperatura de 35 °C e 15% de concentração de inóculo, obtendo 95,3% de remoção de proteína solúvel. Possivelmente a produção de protease foi induzida pela presença significativa de proteína no efluente (4805,7 ±51,3 mg mL⁻¹), servindo como substrato para a secreção de tal enzima.

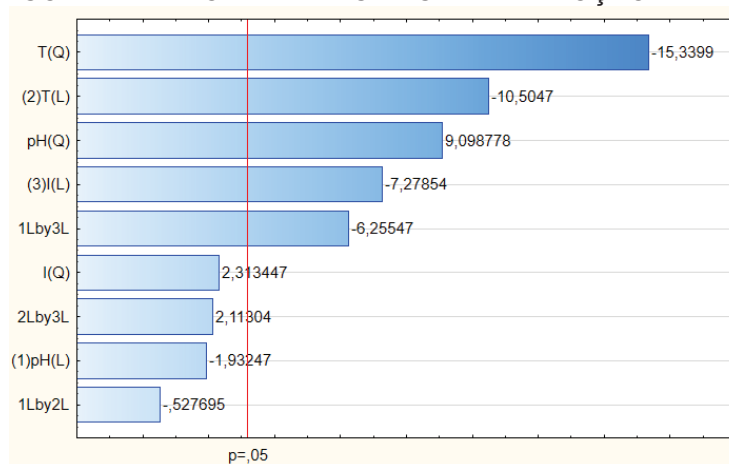
Com os resultados experimentais obtidos (Tabela 25), ajustaram-se os dados para a obtenção de um modelo de regressão linear (eq. 13), relacionando a eficiência de remoção de proteína solúvel com os fatores que apresentaram efeitos significativos no intervalo de confiança de 95%. O modelo de regressão, apresentou R² = 0,6921, o que representa que 69,21% da variação da eficiência de remoção de proteína solúvel (%) é explicada pelo modelo apresentado.

$$\text{Remoção de Proteína solúvel (\%)} = 93,301 + 0,594 \times \text{pH}^2 - 0,612 \times T - 0,926 \times T^2 - 0,424 \times I - 0,476 \times \text{pH} \times I \quad (\text{Eq. 13})$$

A estimativa dos efeitos das variáveis independentes em relação a eficiência de remoção de proteína solúvel é ilustrada no gráfico de Pareto (Figura 12). Os efeitos

que estão à direita da linha vermelha (p -valor = 0,05) são considerados significativos para um intervalo de confiança de 95%.

FIGURA 12 - GRÁFICO DE PARETO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL.



FONTE: O autor (2019).

Analisando a Figura 12 percebe-se que as variáveis temperatura em seu termo linear e quadrático, pH em seu termo quadrático, concentração linear e a interação entre pH e concentração de inóculo influenciaram significativamente a eficiência de remoção de proteína solúvel em um nível de significância de 95%.

Observa-se na Tabela 26, que para a regressão $F_{cal} > F_{tab}$ e tem-se uma razão F_{cal}/F_{tab} maior que 1. Entretanto, verifica-se que a falta de ajuste é significativa, pois F_{calc} é consideravelmente maior que F_{tab} . Ambos os resultados, além do coeficiente de determinação do modelo baixo ($R^2 = 0,6921$), indicam que o modelo não se ajusta adequadamente aos pontos experimentais e que o modelo não é válido.

TABELA 26 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBTIDA PARA A PROTEÍNA SOLÚVEL.

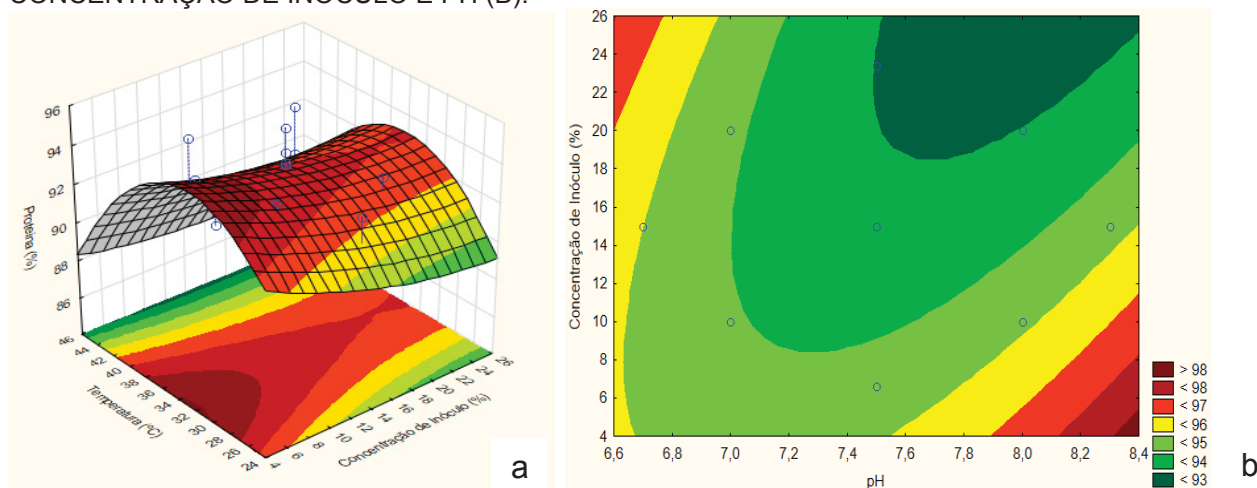
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{cal} (95%)	F_{tab} (95%)	F_{cal}/F_{tab}
Regressão	24,139	5	4,828	13,18	3,11	4,24
Resíduos	4,397	12	0,3664			
Falta de ajuste	12,4054	9	1,378	29,72	8,81	3,37
Erro puro	0,1391	3	0,046			
Total	40,7472	17	2,397			

FONTE: O autor (2019).

Entretanto, apesar da não validação do modelo, é possível avaliar a influência das variáveis independentes sobre a eficiência de remoção de proteína solúvel a partir das superfícies de resposta, indicando a direção a ser tomada numa próxima etapa.

Na Figura 13 é apresentada a superfície de resposta obtida para a eficiência de remoção de proteína solúvel em função da concentração de inóculo e da temperatura (13a), e o gráfico de contorno em função do pH e da concentração de inóculo (13b).

FIGURA 13 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E TEMPERATURA (A). GRÁFICO DE CONTORNO PARA EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO E PH (B).



FONTE: O autor (2019).

Foram constatadas as maiores remoções de proteína solúvel utilizando temperatura em torno de 35 °C, menor concentração de inóculo e maiores valores de pH, obtendo-se também remoções intermediárias em mínima condição de pH e máxima de concentração de inóculo.

Proteases são enzimas hidrolíticas que atuam clivando ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos, sendo industrialmente úteis (INCA-TORRES, 2018). Ao considerar que os efluentes de abatedouros contém uma quantidade significativa de matéria orgânica biodegradável composta principalmente de proteína e lipídeos, é de grande importância ter proteases presentes na hidrólise de proteínas destes efluentes, visto que tais enzimas são capazes de remover DQO e sólidos de águas residuais (DUARTE et al., 2015; RASIT e KUAN, 2018). A remoção de proteínas pode também estar associada à remoção de lipídeos devido à formação de complexos lipídico- proteicos (ALLIE et al., 2003).

Sonune e Garode (2018) verificaram atividade lipolítica e proteolítica nos microrganismos *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter intermedius* isolados de águas residuais municipais, e observaram que

a produção de protease aumentou de 24 para 72 h de incubação em todos os isolados. Abd-alla, Jasim e Hussein (2014) estudaram o isolamento de microrganismos produtores de protease de amostras de água e peixe, e observaram atividade proteolítica de 31,01 U mg⁻¹ de proteína para o isolado de *A. hydrophila*. Yasin, Sanchez-Torres e Maeda (2014) ao avaliar o uso de isolados de *Pseudomonas* e *Aeromonas hydrophila* no tratamento de resíduos de lodo ativado observaram que tais bactérias são capazes de produzir as enzimas lipase e protease, apresentando aumento na atividade de protease com a elevação da temperatura para 30 °C. Além disso, verificaram que o aumento da atividade de protease e lipase nos primeiros 10 dias de reação promoveu a liberação de outros componentes, como proteínas e carboidratos, os quais foram posteriormente degradados por proteases em aminoácidos, resultando na redução de proteína após 20 dias de incubação.

Segundo a literatura as enzimas protease e lipase possuem capacidade de degradar moléculas complexas de resíduo de lodo ativado em estruturas mais simples, resultando em matérias orgânicas solúveis (SHENG et al., 2010; RANI et al., 2012). A secreção de proteases em amostras de lodo de esgoto aumentou a hidrólise do mesmo, decorrente do aumento da clivagem proteolítica das ligações peptídicas, como relatado por Maeda et al. (2011).

Mendes, Pereira e Castro (2006) observaram que a presença de enzimas proteases auxiliam no tratamento de efluentes ricos em gorduras e proteínas, como nos efluentes de laticínios. Os autores verificaram que em 24 h de pré-tratamento com 0,5% (p/v) de uma preparação de lipase de pâncreas suíno, pH 8,0 e, 37 °C em torno de 31% de proteína foi hidrolisada. Já ao submeter este efluente pré-hidrolisado em biodigestão anaeróbica por 15 dias, a temperatura de 35 °C foi obtido 89,6% de remoção de proteína, valor este, inferior a máxima remoção proteica obtido no presente estudo (95,3%), mostrando que o inóculo utilizado apresenta grande potencial de remoção de proteína de efluentes ricos em matéria orgânica.

No estudo de Keffala et al. (2017), os autores avaliaram a biodegradação de efluentes de laticínios utilizando um consórcio contendo os microrganismos *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* isolados de lodo ativado de planta leiteira, com temperatura de 30 °C, pH 7-8, e 150 rpm e verificaram que a maior redução do teor de proteína foi de 78 e 76%, respectivamente, com taxa de inóculo de 5 e 10% (v/v) após 25 dias de reação. Goldwyn et al. (2013), observaram que a bactéria isolada do gênero *Bacillus* removeu o conteúdo proteico de águas residuárias

de laticínios na faixa de 60-93% após 14 dias, devido a alta taxa de atividade proteolítica, que geralmente é encontrada nestes microrganismos.

5.7.11 pH

Na Tabela 27 observa-se a matriz do delineamento experimental, com os níveis de cada variável (pH, temperatura e concentração de inóculo) e os resultados obtidos para o pH, no decorrer dos ensaios realizados.

TABELA 27 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM VALORES REAIS E RESPOSTA QUANTO AO pH.

Ensaio	Variáveis			pH		
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	24 h	48 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	7,06	7,40	8,05
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	7,07	7,28	7,22
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	7,20	7,82	8,40
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	7,29	8,18	7,49
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	7,08	7,27	7,67
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	7,08	7,48	7,64
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	7,32	7,77	8,10
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	7,46	7,65	7,99
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	6,92	7,06	7,19
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	6,87	7,14	7,63
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	7,30	8,01	7,85
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	6,87	7,37	7,61
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	6,84	7,29	7,43
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	6,83	7,05	7,60
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	7,26	7,39	7,65
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	7,24	7,87	7,72
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	7,46	7,65	8,03

FONTE: O autor (2019).

Galaction et al. (2012) relataram que variações no pH podem afetar a degradação de lipídios por microrganismos. Desta forma, as variações no pH foram monitoradas durante o pré-tratamento.

Pode ser observado na Tabela 26 que em alguns ensaios em 24 h ocorreu um ligeiro decréscimo no pH, essa diminuição pode ser devido ao aumento da concentração de ácidos graxos livres formados pela hidrólise dos triglicerídeos presentes no efluente. A liberação de íons H⁺ pelas células para o meio reacional também contribui para a redução do pH (LOPERENA et al., 2007). Após 24 h, o pH apresentou um pequeno aumento, que pode ter sido causado devido à degradação de ácidos graxos e orgânicos com grupos COO⁻ e OH (KRISHNAN e VALSA, 2015). Ou ainda, este aumento pode estar associado à degradação de proteínas e

aminoácidos presentes na água residuária em amônia, que causa o aumento do pH (LOPERENA et al., 2007; RAJAKUMAR et al., 2012).

No estudo de Sonune e Garode (2018) também foi relatado queda no pH inicial e posterior aumento no estudo da biodegradação de águas residuais municipais utilizando bactérias isoladas do próprio resíduo. Alves et al. (2019), observaram que os valores médios de pH diminuiriam ligeiramente após a hidrólise enzimática, de 7,32-7,81 para 6,64-6,89, como consequência da liberação de ácidos graxos livres.

No entanto, apesar destas variações observadas, o valor do pH dos ensaios permaneceu dentro do padrão estabelecido pelas Resolução CONAMA 430 (2011), a qual determina que o pH deve estar entre 5 e 9, e ainda manteve-se na faixa de pH ótimos para atividade da lipase (MOBARAK-QAMSARI et al., 2012; SAADATULLAH et al., 2018; PRASAD e MANJUNATH, 2012). Além disso, para que o efluente possa ser posteriormente submetido a digestão anaeróbia o recomendado é que o pH não se encontre acima de 8,5, visto que acima deste valor pode ocorrer à saponificação ou emulsificação do efluente durante o tratamento anaeróbio (ALVES et al., 2019).

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste estudo para a caracterização do efluente, como concentração de O&G de 2553,3 mg L⁻¹ e DQO de 8914,4 mg L⁻¹, pode ser concluído que a água residuária de abatedouro bovino apresenta alto potencial de impacto ambiental, necessitando de um eficiente tratamento para se adequar aos padrões de lançamentos exigidos pela legislação vigente.

Foi possível isolar seis microrganismos com atividade lipolítica do efluente, sendo que destes a bactéria que apresentou a maior atividade enzimática (2,46 U mL⁻¹), e identificada como *Aeromonas hydrophila*, mostrou potencial para utilização como inóculo no pré-tratamento da água residuária em estudo, uma vez que já se apresenta adaptada ao resíduo com características específicas.

Pelo delineamento experimental utilizado no pré-tratamento enzimático foi observado que as maiores remoções de DQO, O&G e proteína solúvel obtidas foram de 67%, 59% e 95%, respectivamente, decorridos 72 h de reação. Os ensaios realizados demonstraram que diferentes condições de temperatura, pH e concentração de inóculo possuem efeito significativo para redução de tais parâmetros.

Diante disso, a utilização de lipases produzidas por bactérias, como *Aeromonas hydrophila*, se mostra uma alternativa promissora no pré-tratamento de efluentes de abatedouro bovino, pois além de ser uma opção que proporciona redução de custos quando utilizada na sua forma bruta, apresenta significativa diminuição do potencial poluidor de tais efluentes.

7 SUGESTÕES

A partir deste trabalho, ressalta-se a necessidade de mais estudos, incluindo:

- Aprofundar pesquisas que analisem o metabolismo microbiano.
- Avaliar o pré-tratamento do efluente utilizando como inóculo um consórcio de bactérias produtoras de lipase, como da espécie *Bacillus licheniformis*.
- Encontrar o ponto de máxima remoção de DQO, O&G e proteína solúvel.
- Avaliar o pré-tratamento utilizando outros valores para os níveis das variáveis independentes, visando a maximização dos parâmetros.
- Comparar o desempenho do inóculo de microrganismos isolados do efluente e um produto comercial.
- Avaliar a utilização de amostra de efluente autoclavado, verificando a influência do tratamento enzimático sem a presença dos microrganismos naturalmente presentes no efluente.
- Analisar o uso de biossurfactante no sistema de pré-tratamento.
- Determinar a atividade proteolítica das bactérias isoladas.
- Realizar a purificação e concentração das enzimas produzidas.

REFERÊNCIAS

- ABIEC.a - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da pecuária no Brasil – relatório anual**. Disponível em: < <http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf> >, 2018. Acesso em 03 de janeiro.
- ABIEC.b - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/download/Release%20Coletiva%20de%20Imprensa%20Abiec_2018.pdf>, 2018. Acesso em 03 de janeiro.
- ABD-ALLA, M. T.; JASIM, H. M.; HUSSEIN, A. A. Isolation and Identification of protease producing *Aeromonas hydrophila*. **Al-Nahrain Journal of Science**, v. 17, n. 1, p. 143-147, 2014.
- ADEKUNLE, K. F.; OKOLIE, J. A. A review of biochemical process of anaerobic digestion. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 6, n. 03, p. 205, 2015.
- ADULKAR, T. V.; RATHOD, V. K. Pre-treatment of high fat content dairy wastewater using different commercial lipases. **Desalination and Water Treatment**, v. 53, n. 9, p. 2450-2455, 2013.
- AFFANDI, I. E.; SURATMAN, N. H.; ABDULLAH, S.; AHMAD, W. A.; ZAKARIA, Z. A. Degradation of oil and grease from high-strength industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 33-40, 2014.
- AFFES, M.; ALOUI, F.; HADRICH, F.; LOUKIL, S.; SAYADI, S. Effect of bacterial lipase on anaerobic co-digestion of slaughterhouse wastewater and grease in batch condition and continuous fixed-bed reactor. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 195, 2017.
- ALBERTON, D.; MITCHELL, D. A.; CORDOVA, J.; ZAMORA, P. P.; Krieger, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microspores* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technol. Biotechnol**, v. 48, n.1, p. 28-35, 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALEXANDRE, V. M. F.; VALENTE, A. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre hydrolyzed with a solid enzyme pool. **Renewable Energy**. v. 36, p. 3439-3444, 2011.
- ALHAMDANI, M.A.A.; ALKABBI, H.J.J. Isolation and identification of lipase producing bacteria from oil-contaminant soil. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v.6, n.20, p.1-7, 2016.

ALLIE, Z.; JACOBS, E. P.; MAARTENS, A.; SWART, P. Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by abattoir effluent. **Journal of membrane science**, v. 218, n. 1-2, p. 107-116, 2003.

ALMEIDA, A.F.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Acid lipase from *Candida viswanathii*: production, biochemical properties, and potential application. **BioMed research international**, p.1-10, 2013.

ALVES, A. M.; DE MOURA, R. B.; CARVALHO, A. K.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. *Penicillium citrinum* whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 433-438, 2019.

ALVES, M. M.; VIEIRA, J. M.; PEREIRA, R. Á.; PEREIRA, M. A.; MOTA, M. Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part I: biofilm growth and activity. **Water Research**, v. 35, n. 1, p. 255-263, 2001.

AL-WASIFY, R.S.; ALI, M. N.; HAMED, S. R. Biodegradation of dairy wastewater using bacterial and fungal local isolates. **Water Science and Technology**, v. 76, n. 11, p. 3094-3100, 2017.

ALY, M. M.; TORK, S.; AL-GARNI, S. M.; NAWAR, L. Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 6, p. 1125-1137, 2012.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods of the Examination of Water and Wastewater. 21 ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

ANBU, P.; NOH, M.; KIM, D.; SEO, J.; HUR, B.; MIN, K. H. Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. **Afr J Biotechnol**, v.10, p. 4147-4156, 2011.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 343, p. 177-183, 1999.

ARRUDA, V. C. M. **Tratamento anaeróbio de efluentes gerados em matadouros de bovinos**. 2004. 148f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

BALDO, C.; BAGGIO, L. M.; MORENO, T. G.; MAGRI, A.; DE MELO, M. R.; GASPARIN, F. G. M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Estudo da produção de lipase por bactérias isoladas de efluente de abatedouro avícola. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 347-350, 2013.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties-a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.

BARROS, N. B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos**. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3. ed. Editora da Unicamp, 2007.

BECKER, J. M.; CALDWELL, G. A.; ZACHGO, E. A. Exercise 1 – Aseptic Technique and Establishing Pure Cultures: The Streak Plate and Culture Transfer. In: _____. **BIOTECHNOLOGY: A Laboratory Course**. 2.ed. Academic Press, 1996. p. 9-16.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BEUX, S.; NUNES, E.; BARANA, A. C. Effect of temperature on two-phase anaerobic reactors treating slaughterhouse wastewater. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1061-1072, 2007.

BIZANI, D.; BRANDELLI, A. Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 334-339, 2001.

BORNSCHEUER, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002.

BOROWSKI, S.; KUBACKI, P. Co-digestion of pig slaughterhouse waste with sewage sludge. **Waste management**, v. 40, p. 119-126, 2015.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. V. 1. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

BOTIŞ, M. Purification of the wastewater from meat industry. **Journal on processing and Energy in Agriculture**, v. 19, n. 1, p. 21-23, 2015.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROOKSBANK, A. M.; LATCHFORD, J. W.; MUDGE, S. M. Degradation and modification of fats, oils and grease by commercial microbial supplements. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 977-985, 2007.

BUENO, P.R.M.; OLIVEIRA, T.F.; CALIARI, M.; CASTIGLIONI, G.L.; SOARES JÚNIOR, M.S. Selection and optimization of extracellular lipase production using agro-industrial waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 566-573, 2014.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. F.; MEHRVAR, M. Slaughterhouse wastewater characteristics, treatment, and management in the meat processing industry: A review on trends and advances. **Journal of Environmental Management**, v. 161, p. 287-302, 2015.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. F.; MEHRVAR, M.; QUIÑONES-BOLAÑOS, E. Combined anaerobic-aerobic and UV/H₂O₂ processes for the treatment of synthetic

slaughterhouse wastewater. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 48, n. 9, p. 1122-1135, 2013.

BUSTILLO-LECOMPTE, C.; MEHRVAR, M. Slaughterhouse wastewater: treatment, management and resource recovery. **Physico-Chemical Wastewater Treatment and Resource Recovery**. InTech, 2017.

BUSTILLO-LECOMPTE, C.; MEHRVAR, M.; QUIÑONES-BOLAÑOS, E. Slaughterhouse wastewater characterization and treatment: an economic and public health necessity of the meat processing industry in Ontario. **Journal of Geoscience and Environment Protection**, v. 4, n. 04, p. 175, 2016.

CAIXETA, C. E. T.; CAMMAROTA, M. C.; XAVIER, A. M. F. Slaughterhouse wastewater treatment: evaluation of a new three-phase separation system in a UASB reactor. **Bioresource Technology**, n. 81, p. 61-69, 2002.

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

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 14, p. 111-123, 2001.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, São Paulo, 2004.

CARVALHO, A.C.L.M.; FONSECA, T.S.; MATTOS, M.C.; OLIVEIRA, M.C.F.; LEMOS, T.L.G.; MOLINARI, F.; ROMANO, D.; SERRA, I. Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 12, p. 29682-29716, 2015.

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

CAVALEIRO, A. J.; FERREIRA, T.; PEREIRA, F.; TOMMASO, G.; ALVES, M. M. Biochemical methane potential of raw and pre-treated meat-processing wastes. **Bioresource technology**, v. 129, p. 519-525, 2013.

CAVALLINI, G. S.; SILVA, W. P.; GONZAGA, M. F. Desinfecção de efluente final de abatedouro de bovinos com ácido peracético para fins de reúso. **DESAFIOS**, v. 4, n. 4, p. 41-50, 2017.

CHAN, Y.J.; CHONG, M.F.; LAW, C.L.; HASSELL, D.G. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v.155, p. 1-18, 2009.

CHEN, S.; TONG, X.; WOODARD, R. W.; DU, G.; WU, J.; CHEN, J. Identification and characterization of bacterial cutinase. **Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 38, p. 25854-25862, 2008.

CHIPASA, K. B.; MĘDRZYCKA, K. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 635-645, 2006.

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: A review. **Biopharm Journal**, v.1, n.2, p. 41–47, 2015.

CHRISTOPHER, N.; KUMBALWAR, M. Enzymes used in Food Industry: A Systematic Review. **International Journal Of Innovative Research In Science, Engineering And Technology**, v. 4, n. 10, p.9830-9836, 2015.

CHUANG, Y.C.; CHIOU, S.F.; SU, J.H.; WU, M.L.; CHANG, M.C. Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. **Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 803-812, 1997.

CRUZ L.M.; SOUZA E.M.; WEBER O.B.; BALDANI J.I.; DÖBEREINER J.; PEDROSA F.O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananascomosus* (L.) Merrill). **Appl Environ Microb.**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

CUADROS, F.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, F.; RUIZ-CELMA, A.; RUBIALES, F.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, A. Recycling, reuse and energetic valuation of meat industry wastes in Extremadura (Spain). **Resources, conservation and recycling**, v. 55, n. 4, p. 393-399, 2011.

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

DAMASCENO, F. R.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; KOOKOS, I. K.; KOUTINAS, A. A.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. Treatment of wastewater with high fat content employing an enzyme pool and biosurfactant: technical and economic feasibility. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 2, p. 531-542, 2018.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S.C.; FREIRE. D.M. G; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.676-68, 2008.

DAOUD, L.; KAMOUN, J.; ALI, M.B.; JALLOULI, R.; BRADAI, R.; MECHICHI, T.; GARGOURI, Y.; ALI, Y. B.; ALOULOU, A. Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 232-237, 2013.

DE CARVALHO, T. B.; DE ZEN, S. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista iPecege**, v. 3, n. 1, p. 85-99, 2017.

DE NARDI, I. R.; FUZI, T. P.; DEL NERY, V. Performance evaluation and operating strategies of dissolved-air flotation system treating poultry slaughterhouse wastewater. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 52, n. 3, p. 533-544, 2008.

DE SENA, R.F.; MOREIRA, R.F.P.M.; JOSÉ, H.J. Comparison of coagulants and coagulation aids for treatment of meat processing wastewater by column flotation. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8221-8225, 2008.

DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; MARTINS, R. C.; ROCHA, W. L.; DIAS, A. P. Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. **Biotechnology Applied Biochemistry**. Indianapolis, USA, v. 26, p. 111-116, 1997.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T. T. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2583-2595, 2005.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 6. ed. Blucher: São Paulo, 2007.

DEWAN, S.S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications – BIO030H. BCC Res. URL: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>, 2017. Acesso em: 24/01/2019.

DIAS, I. C. L.; CASTRO, A. C. L. O processo de abate de bovinos: implicações para a saúde e o ambiente. **Cad. Pesq., São Luís**, v. 18, n. especial, p. 39-48, 2011.

DJEKIC, I. Environmental impact of meat industry—current status and future perspectives. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 61-64, 2015.

DORS, G.; MENDES, A.A.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; FURIGO JR., A. Simultaneous Enzymatic Hydrolysis and Anaerobic Biodegradation of Lipid-rich Wastewater from Poultry Industry. **Applied Water Science**, v. 3, n. 1, p.343-349, 2013.

DUARTE, J. G.; SILVA, L. L. S.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C.; GUTARRA, M. L. E. Enzymatic hydrolysis and anaerobic biological treatment of fish industry effluent: Evaluation of the mesophilic and thermophilic conditions. **Renewable Energy**, v. 83, p. 455-462, 2015.

DUZA, M.B.; MASTAN, S. Optimization of lipase production from *Bacillus thuringiensis* (TS11BP), *Achromobacter xylosoxidans* J2 (TS2MCN)-isolated from soil sediments near oilseed farm. **IOSR J. Pharm. Biol. Sci**, v. 9, p. 66-76, 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry, Washington-DC**, v. 28, n. 3, p.350-356, 1956.

- EDUPUGANTI, S.; PARCHA, L.; MANGAMOORI, L. N. Purification and Characterization of Extracellular Lipase from *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 10656). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 7, n. 01, p. 057-063, 2017.
- EKINCI, A. P.; DINÇER, B.; BALTAŞ, N.; ADIGÜZEL, A. Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 2, p. 325-331, 2016.
- EL-BESTAWY, E.; AL-FASSI, F.; AMER, R.; ABUROKBA, R. Biological Treatment of Leather-Tanning Industrial Wastewater Using Free Living Bacteria. **Advances in Life Science and Technology**. v.12, 2013.
- ESCOBAR-NIÑO, A.; LUNA, C.; LUNA, D.; MARCOS, A. T.; CÁNOVAS, D.; MELLADO, E. Selection and characterization of biofuel-producing environmental bacteria isolated from vegetable oil-rich wastes. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104063, 2014.
- FARZADKIA, M.; VANANI, A. F.; GOLBAZ, S.; SAJADI, H. S.; BAZRAFSHAN, E. Characterization and evaluation of treatability of wastewater generated in Khuzestan livestock slaughterhouses and assessing of their wastewater treatment systems. **Glob. Nest J**, v. 18, p. 108-118, 2016.
- FESTUS, F. I.; PHEBE, A. Q. Optimization of Lipase Production by *Bacillus megaterium*. **Biotechnology Journal International**, v. 18, n. 2, p.1-11, 2017.
- FLORINDO, T. J.; MEDEIROS, G. I. B.; COSTA, J. S.; RUVIARO, C. F. Competitividade dos principais países exportadores de carne bovina no período de 2002 a 2013. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 12, n. 1, p. 2-3, 2015.
- FREIRE, D. M. G.; GOMES, P. M.; BON, E. P. S.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G. L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 6-12, 1997.
- FURINI, G.; BERGER, J. S.; CAMPOS, J. A.; SAND, S. T.; GERMANI, J. C. Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2955-2965, 2018.
- GANDHI, K.; SARKAR, P.; AGHAV, A.; HAZRA, T.; LAL, D. Modified Milk Fat and Its Applications in Food Products. **Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 16-24, 2018.
- GHAEDI, M.; AZAD, F. N.; DASHTIAN, K.; HAJATI, S.; GOUDARZI, A.; OYLAK, M. Central composite design and genetic algorithm applied for the optimization of ultrasonic-assisted removal of malachite green by ZnO nanorod-loaded activated carbon. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 167, p. 157-164, 2016.

GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D.; ROTARU, R.; LUPASTEANU, A. M.; TURNEA, M. Kinetic studies on biodegradation of lipids from olive oil mill wastewaters with free and immobilized bacillus sp. cells. **Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry**, v. 13, n. 1, p. 49, 2012.

GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**, v. 36, p. 139-147, 2005.

GOLDWYN, L. P.; SASEETHARAN, M. K.; JEYANTHI, J.; NUZRAT, B. N. Experimental study on biodegradation of dairy wastewater using bacterial isolate. **Journal of environmental science & engineering**, v. 55, n. 4, p. 472-480, 2013.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V. D.; SILVA, G. D. S.; CASTRO, H. F. D. Assessment of catalytic properties in aqueous and organic media of lipase from *Candida rugosa* immobilized on wood cellulignin activated with carbonyldiimidazole. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 710-718, 2006.

GONÇALVES, F. A. G. Produção de lipase extracelular por leveduras de cultivo submerso. 2007. 67 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)** – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; ANBU, P. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. **Mycoscience**, v. 46, n. 2, p. 119-126, 2005.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **Ocl**, v. 24, n. 4, p. D403, 2017.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

GUREL L.; BUYUKGUNGOR H. Treatment of slaughterhouse plant wastewater by using a membrane bioreactor. **Water Science and Technology**, v.64, p.214-219, 2011.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, v. 22, p. 205-209, 1971.

HARRIS, P. W.; MCCABE, B. K. Review of pre-treatments used in anaerobic digestion and their potential application in high-fat cattle slaughterhouse wastewater. **Applied Energy**, v. 155, p. 560-575, 2015.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEE, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme MicrobTechnol**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HUSAIN, I. A.; ALKHATIB, M. A. F.; JAMMI, M. S.; MIRGHANI, M. E.; ZAINUDIN, Z. B.; HODA, A. Problems, control, and treatment of fat, oil, and grease (FOG): a review. **Journal of oleo science**, v. 63, n. 8, p. 747-752, 2014.

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

IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: **Estatística da produção pecuária - terceiro trimestre 2018**. Disponível em: < https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2018_3tri.pdf >, 2018.

INCA-TORRES, A. R.; URBINA-SALAZAR, A. D. R.; FALCÓN-GARCÍA, G.; CARBONERO-AGUILAR, P.; MORGADO, B. R.; PARRADO, J.; BAUTISTA, J. Hydrolytic enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge. **Journal of Biotech Research**, v. 9, 2018.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **PORTARIA N° 29 DE 06/02/2018**: Estabelece critérios para o Licenciamento Ambiental de empreendimentos de bovinocultura confinada e semiconfinada de leite e de bovinocultura confinada de corte, com aproveitamento econômico, nos termos que especifica. Paraná: IAP, 2018.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. Biochemical Nomenclature Committees. **Enzyme nomenclature**. London: IUBMB, 2009. Acesso em: 21 jan. 2019.

IZRAEL-ZIVKOVIC, L. T.; GOJGIC-CVIJOVIC, G. Đ.; GOPCEVIC, K. R.; VRVIC, M. M.; KARADZIC, I. M. Enzymatic characterization of 30 kDa lipase from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Journal of basic microbiology**, v. 49, n. 5, p. 452-462, 2009.

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

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, A. Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR-UASB system, **Chemosphere**, v. 67, n. 8, p. 1492-1501, 2007.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. **Journal of cleaner production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

JENSEN, P. D.; YAP, S. D.; BOYLE-GOTLA, A.; JANOSCHKA, J.; CARNEY, C.; PIDOU, M.; BATSTONE, D. J. Anaerobic membrane bioreactors enable high rate treatment of slaughterhouse wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, n. 97, p. 132-141, 2015.

JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 66, p. 264-269, 2010.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7563-7577, 2013.

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

KANMANI, P.; ARAVIND, J.; KUMARESAN, K. An insight into microbial lipases and their environmental facet. **International journal of environmental science and technology**, v. 12, n. 3, p. 1147-1162, 2015.

KEFFALA, C.; ZOUHIR, F.; ABDALLAH, B. H.; KAMMOUN, S. Use of bacteria and yeast strains for dairy wastewater treatment. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 6, n. 4, p. 108-113, 2017.

KEMPKA, A. P.; CELUPPI, R.; REVELLO, J, H. P. Lipase and phospholipase in the hydrolysis of lipids in wastewater from swine slaughterhouse and subsequent biological treatment study. **Journal of Agricultural Science and Technology. A**, v. 3, n. 10A, p. 757, 2013.

KEMPKA, A. P.; FAGUNDES, E.; SANTOS, G. P. D.; MAFESSONI, K.; HEINZEN, V. D. Phospholipase immobilized in the hydrolysis of lipid fraction of the wastewater slaughterhouse swine: comparison with enzyme free. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 23, n. 2, p. 395-403, 2018.

KESKES S.; HMAIED F.; GANNOUN H.; BOUALLAGUI H.; GODON J.J.; HAMDI M. Performance of a submerged membrane bioreactor for the aerobic treatment of abattoir wastewater. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 28-34, 2012.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793-1806, 2015.

KIRANA, S.; ARSHADA, Z.; NOSHEENB, S.; KAMALA, S.; GULZARA, T.; MAJEEDA, M. S.; JANNATA, M.; RAFIQUEC, M. A. Microbial Lipases: Production and Applications: A Review. **Journal of Biochemistry Biotechnology and Biomaterials**, v. 1, n. 2, p. 7-20, 2016.

KLAUCANS, E.; SAMS, K. Problems with Fat, Oil, and Grease (FOG) in Food Industry Wastewaters and Recovered FOG Recycling Methods Using Anaerobic Co-Digestion: A Short Review. **Key Engineering Materials**, p. 61-68, 2018.

KOLB, M.; BAHADIR, M.; TEICHGRÄBER, B. Determination of chemical oxygen demand (COD) using an alternative wet chemical method free of mercury and dichromate. **Water research**, v. 122, p. 645-654, 2017.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K-H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2 ed. Nova York: Thieme, 2005.

KRISHNAN, N.; VALSA, A. K. Biodegradation of lipid rich dairy effluent by bacterial consortium. **IOSR J of Environ Sci Toxicol and Food Technol**, v. 9, n. 9, p. 16-20, 2015.

KURNIAWAN, T. A.; CHAN, G. Y.; LO, W. H.; BABEL, S. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. **Chemical engineering journal**, v. 118, n. 1-2, p. 83-98, 2006.

LAI, O.M.; LEE, Y.Y.; PHUAH, E.T.; AKOH, C.C. Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications. **Encyclopedia Of Food Chemistry**, v.2, p.158-167, 2019.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; ANNA JR, S. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

LEAL, M.C.C.R.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C.; SANT'ANA, G.L., JR. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1173-1178, 2006.

LEE, K.H.; ISHIKAWA, T.; SASAKI, S.; ARIKAWA, Y.; KARUBE, I. Chemical oxygen demand (cod) sensor using a stopped-flow thin layer electrochemical cell. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 11, n. 16, p. 1172-1179, 1999.

LEE, L. P.; KARBUL, H. M.; CITARTAN, M.; GOPINATH, S. C.; LAKSHMIPRIYA, T.; TANG, T. H. Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil-contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. **BioMed research international**, p.1-9, 2015.

LEHNINGER, A. L. **Princípios da Bioquímica**, 2. ed. São Paulo: Savier, 1986.

LI, J.; LUO, G.; HE, L.; XU, J.; LYU, J. Analytical approaches for determining chemical oxygen demand in water bodies: A review. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 48, n. 1, p. 47-65, 2018.

LI, L.; DYER, P. W.; GREENWELL, H. Christopher. Biodiesel Production via Trans-Esterification Using *Pseudomonas cepacia* Immobilized on Cellulosic Polyurethane. **ACS omega**, v. 3, n. 6, p. 6804-6811, 2018.

LI, M.; YANG, L. R.; XU, G.; WU, J. P. Cloning and characterization of a novel lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* GS11: the first member of a new bacterial lipase family XVI. **Journal of biotechnology**, v. 228, p. 30-36, 2016.

LI, W.; JIA, M. X.; DENG, J.; WANG, J. H.; LIN, Q. L.; LIU, C.; WANG, S.S.; TANG, J.X.; ZENG, X.X.; MA, L.; SU, W.; LIU, X.X.; CAI, F.; ZHOU, L.Y. Isolation, genetic identification and degradation characteristics of COD-degrading bacterial strain in slaughter wastewater. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 8, p. 1800-1805, 2018.

LIMA, V. O. Pré-tratamento de efluente de curtume por bactérias e enzima lipolíticas. 90 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)** - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

LINKO, Y. Y.; LAMSA, M.; UOSUKAINEN, E.; SEPPALLA, J.; LINKO, P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 41-50, 1998.

LIU, C. H.; CHEN, C. Y.; WANG, Y. W.; CHANG, J. S. Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. **Biochemical engineering journal**, v. 58, p. 96-102, 2011.

LOPERENA, L.; FERRARI, D.; DÍAZ, A. L.; INGOLD, G.; PÉREZ, L. V.; CARVALLO, F.; TRAVERS, D.; MENS, R. J.; LAREO, C. Isolation and selection of native microorganisms for the aerobic treatment of simulated dairy wastewaters. **Bioresource Technology**, Fayetteville, v. 100, p. 762-1766, 2009.

LOPERENA, L.; FERRARI, M. D.; SARAVIA, V.; MURRO, D.; LIMA, C.; FERNÁNDEZ, A.; LAREO, C. Performance of a commercial inoculum for the aerobic biodegradation of a high fat content dairy wastewater. **Bioresource technology**, v. 98, n. 5, p. 1045-1051, 2007.

LOTTRAKUL, P.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal of biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 113-120, 1997.

LUSTE, S.; LUOSTARINEN, S.; SILLANPÄÄ, M. Effect of pre-treatments on hydrolysis and methane production potentials of by-products from meat-processing industry. **Journal of hazardous materials**, v. 164, n. 1, p. 247-255, 2009.

MAEDA, T.; YOSHIMURA, T.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; OGAWA, H. I. Purification and characterization of a serine protease secreted by *Brevibacillus* sp. KH3 for reducing waste activated sludge and biofilm formation. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10650-10656, 2011.

MAHDI, B. A.; BHATTACHARYA, A.; GUPTA A. Enhanced lipase production from *Aeromonas* sp. S1 using Sal deoiled seed cake as novel natural substrate for potential application in dairy wastewater treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 87, n.3, p.418-426, 2012.

MANIOS, T.; GAKI, E.; BANOU, S.; KLIMATHIANOU, A.; ABRAMAKIS, N.; SAKKAS, N. Closed wastewater cycle in a meat producing and processing industry. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 38, n. 4, p. 335-345, 2003.

MARTINELLI, T. M.; JUNIOR, O. R.; CERESER, N. D.; CARDOZO, M. V.; KAMIMURA, B. A.; NESPOLO, N. M.; PINTO, F. R. Ocorrência de *Aeromonas* spp. em abatedouro bovino e sensibilidade a antimicrobianos. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 77, n. 2, p. 195-202, 2010.

MARTÍNEZ, E. J.; FIERRO, J.; SÁNCHEZ, M. E.; GÓMEZ, X. Anaerobic co-digestion of FOG and sewage sludge: Study of the process by Fourier transform infrared spectroscopy. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, p. 1-6, 2012.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S. P. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 76, n. 6, p. 629-635, 2001.

MASSE, L.; MASSÉ, D. I.; KENNEDY, K. J. Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. **Process biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1365-1372, 2003.

MAZZUCOTELLI, C. A.; DURRUTY, I.; KOTLAR, C. E.; MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; ROURA, S. I. Development of a microbial consortium for dairy wastewater treatment. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 19, n. 2, p. 221-230, 2014.

MCCABE, B. K.; HARRIS, P.; BAILLIE, C.; PITTAWAY, P.; YUSAF, T. Assessing a new approach to covered anaerobic pond design in the treatment of abattoir wastewater. **Australian Journal of Multi-Disciplinary Engineering**, v. 10, n. 1, p. 81-93, 2013.

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

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

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

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

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

MENG, Y.; LUAN, F.; YUAN, H.; CHEN, X.; LI, X. Enhancing anaerobic digestion performance of crude lipid in food waste by enzymatic pretreatment. **Bioresource technology**, v. 224, p. 48-55, 2017.

MESSIAS, Josana M.; COSTA, Bruna Z.; LIMA, Valéria M. G.; GIESE, Ellen C.; DEKKER, Robert F. H.; BARBOSA, Aneli M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

METCALF, L.; EDDY, H. P. Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. 5. ed. **McGraw-Hill Brasil**, 2015.

METCALF, L.; EDDY, H. Wastewater engineering: treatment and reuse. 4. ed. **McGraw-Hill Brasil**, New York, 1819p, 2003.

MIGNARD, S.; FLANDROIS J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. **Journal Microbiological Methods**. v. 67, p. 574–581, 2006.

MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZLEZ, J. Characteristics of na immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65. n. 6, p. 927-931, 1988.

MITTAL, G. S. Treatment of wastewater from abattoirs before land application—a review. **Bioresource technology**, v. 97, n. 9, p. 1119-1135, 2006.

MOBARAK-QAMSARI, E.; KASRA-KERMANSHAHI, R.; NOSRATI, M.; AMANI, T. Enzymatic pre-hydrolysis of high fat content dairy wastewater as a pretreatment for anaerobic digestion. **International Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 2, p. 475-480, 2012.

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

MUKESH-KUMAR, D. J.; REJITHA, R.; DEVIKA, S.; BALAKUMARAN, M. D.; IMMACULATE, A.; KALAICHELVAN, P. T. Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus* sp. MPTK 912 isolated from oil mill effluent. **Adv. Appl. Sci. Res**, v. 3, n. 2, p. 930-938, 2012.

NAKHLA, G.; AL-SABAWI, M.; BASSI, A.; LIU, V. Anaerobic treatability of high oil and grease rendering wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 102, n. 2-3, p. 243-255, 2003.

NEELAMBARI, V.; VASANTHABHARATHI, V.; BALASUBRAMANIAN, R.; JAYALAKSHMI, S. Lipase from marine *Aeromonas hydrophila*. **Res J Microbiol**, v. 6, p. 658-668, 2011.

NEILSON, A. H. The occurrence of aeromonads in activated sludge: isolation of *Aeromonas sobria* and its possible confusion with *Escherichia coli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 44, n. 2, p. 259-264, 1978.

NELSON, D.L.; COX, M. **Lehninger- Principios de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed. 5ª edição, 1273 p.2011.

NISOLA, G. M.; CHO, E. S.; SHON, H. K.; TIAN, D.; CHUN, D. J.; GWON, E. M.; CHUNG, W. J. Cell immobilized FOG-trap system for fat, oil, and grease removal from restaurant wastewater. **Journal of environmental engineering**, v. 135, n. 9, p. 876-884, 2009.

NOUSOPOULOS, C.; MAMAI, D.; ANTONIOU, K.; AVRAMIDES, C.; OIKONOMOPOULOS, P.; FOUNTOULAKIS, I. Anaerobic co-digestion of grease sludge and sewage sludge: The effect of organic loading and grease sludge content. **Bioresource technology**, v. 131, p. 452-459, 2013.

OLIVEIRA, C.D.S.; COELHO, P.N.; DE SÁ, O.R. Avaliação da eficiência do tratamento de efluentes em um abatedouro do município de Passos, MG, Brasil. **Ciência ET Praxis**, v. 8, n. 16, p. 13-20, 2017.

OLIVEIRA, T. F. D.; HIDÁLGO, M. R.; SOARES JÚNIOR, M. S. Production of lipase extrated from aqueous waste: enzymatic activity kinetics. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 6, p. 562-572, 2014.

PACHECO, J. W. F.; YAMANAKA, H. T. **Guia técnico ambiental de abates (bovino e suíno): Série P+L**. São Paulo: CETESB, 2008.

PADILHA, G. D. S.; SANTANA, J. C. C.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.55, n.1, p. 7-19, 2012.

PADMAPRIYA, B.; RAJESWARI, T.; NOUSHIDA, E.; SETHUPALAN, D. G.; VENIL, C. K. Production of lipase enzyme from *Lactobacillus* spp. and its application in the degradation of meat. **World Applied Sciences Journal**, v. 12, n. 10, p. 1798-1802, 2011.

PANDEY, K.; SINGH, B.; PANDEY, A. K.; BADRUDDIN, I. J.; PANDEY, S.; MISHRA, V. K.; JAIN, P. A Application of microbial enzymes in industrial waste water treatment. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 6, n. 8, p. 1243-1254, 2017.

PATEL, P.; DESAI, B. Isolation, identification and production of lipase producing bacteria from oil contaminated soil. **BMR Microbiology**, v.4, n.1, p.1-7, 2018.

PATIL, K.J.; CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 8, p. 971-982, 2011.

PEIL, G. H.; KUSS, A. V.; RAVE, A. F.; VILLARREAL, J. P.; HERNANDES, Y. M.; NASCENTE, P. S. Bioprospecting of lipolytic microorganisms obtained from industrial effluents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1769-1779, 2016.

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

PEREIRA, M.A.; PIRES, O.C.; MOTA, M.; ALVES, M.M. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. **Biotechnology and bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 15-23, 2005.

POFFE, R.; BEECK, E. O. Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, n. 4, p. 366-370, 1991.

PORWAL, H. J.; MANE, A. V.; VELHAL, S. G. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. **Water Resources and Industry**, v. 9, p. 1-15, 2015.

PRASAD, M. P.; MANJUNATH, K. Effect of media and process parameters in the enhancement of extracellular lipase production by bacterial isolates from industrial effluents. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 8, p. 308, 2012.

PRIMASARI, B.; IBRAHIM, S.; ANNUAR, M. S. M.; REMMIE, L. X. I. Aerobic treatment of oily wastewater: effect of aeration and sludge concentration to pollutant reduction and PHB accumulation. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 78, p. 172-176, 2011.

PRIYADHARSHINI, M.; KUMAR, R. S. Biodegradation of dairy wastewater using bacterial isolates. **International Journal Of Modern Trends In Engineering And Science**, v. 3, n. 7, p.133-138, 2016.

RAJAKUMAR, R.; MEENAMBAL, T.; SARAVANAN, P. M.; ANANTHANARAYANAN, P. Treatment of poultry slaughterhouse wastewater in hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor packed with pleated poly vinyl chloride rings. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 116-122, 2012.

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

RAMNATH, L.; SITHOLE. B.; GOVINDEN, R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. **Canadian journal of microbiology**, v. 63, n. 3, p. 179-192, 2016.

RANI, R. U.; KUMAR, S. A.; KALIAPPAN, S.; YEOM, I. T.; BANU, J. R. Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 415-424, 2012.

RASIT, N.; KUAN, O. C. Investigation on the Influence of Bio-catalytic Enzyme Produced from Fruit and Vegetable Waste on Palm Oil Mill Effluent. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, 2018.

RATLEDGE, C. Microbial oxidations of fatty alcohols and fatty acids. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 55, n. 4, p. 399-400, 1992.

RAY, A. Application of lipase in industry. **Asian Journal of Pharmacy and Technology**, v. 2, n. 2, p. 33-37, 2012.

RAY, R. C.; ROSELL, C. M. Lipase: Properties, Functions and Food Applications. **Microbial Enzyme Technology in Food Application**, p. 228-254, 2017.

REZVANI, M.; NAJAFPOUR, G.; MOHAMMADI, M.; ZARE, H. Amperometric biosensor for detection of triglyceride tributyrin based on zero-point charge of activated carbon. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, n. 2, p. 268-277, 2017.

RIBEIRO, E. A. **Tratamento de efluente de abate bovino com lagoas de estabilização e impacto do lançamento sobre o corpo receptor**. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2010.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P.; OLIVEIRA, D. D.; FREIRE, D. M.; LUCCIO, M. D. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 9, p. 1243-1248, 2008.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1-41, 2015.

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

ROMANO, D.; BONOMI, F.; DE MATTOS, M. C.; DE SOUSA FONSECA, T.; DE OLIVEIRA, M. D. C. F.; MOLINARI, F. Esterases as stereoselective biocatalysts. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 5, p. 547-565, 2015.

ROSA, D. R. **Tratamento enzimático/biológico de efluentes com alto teor de gordura**. 2004. 107 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ROSA, D. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, v. 23, n. 5, p. 814-823, 2006.

ROSA, D. R.; DUARTE, I. C.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6170-6176, 2009.

ROUSENAU, F.; JAEGER, K. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1023-1032, 2000.

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

SAADATULLAH, I. M.; JAN, M.; WAHEEDULLAH, N. M.; UR REHMAN, Z. Isolation, Identification and Characterization of a Lipase Producing *Pseudomonas*. **Journal of Biomaterials**, v. 2, n. 2, p. 51-57, 2018.

SABAT, S.; MURTHY, V. K.; PAVITHRA, M.; MAYUR, P.; CHANDAVAR, A. Production and characterisation of extracellular lipase from *Bacillus stearothermophilus* MTCC 37 under different fermentation conditions. **Journal of Engineering Research and Applications (IJERA) ISSN**, v. 2248, p. 9622, 2012.

SADDOUD A.; SAYADI S. Application of acidogenic fixed-bed reactor prior to anaerobic membrane bioreactor for sustainable slaughterhouse wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v.149, p. 700-706, 2007.

SALAMA, E. S.; SAHA, S.; KURADE, M. B.; DEV, S.; CHANG, S. W.; JEON, B. H. Recent trends in anaerobic co-digestion: Fat, oil, and grease (FOG) for enhanced biomethanation. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 70, p. 22-42, 2019.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Production and applications of microbial lipases: a review. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 30, p. 2667-2677, 2012.

SALMINEN, E. A.; RINTALA, J. A. Semicontinuous anaerobic digestion of solid poultry slaughterhouse waste: effect of hydraulic retention time and loading. **Water Research**, v. 36, n. 13, p. 3175-3182, 2002.

SARASWAT, R.; VERMA, V.; SISTLA, S.; BHUSHAN, I. Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *Bacillus* strain for detergent formulation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 33-38, 2017.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; YAMUNA RANI, K.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 1, p. 5-28, 2018.

SAYGÜN, A.; ŞAHIN-YEŞİLÇUBUK, N.; ARAN, N. Effects of different oil sources and residues on biomass and metabolite production by *Yarrowia lipolytica* YB 423-12. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 9, p. 1521-1530, 2014.

SCARASSATI, D.; CARVALHO, R.F.; DELGADO, V.L.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; TONSO, S.; SOBRINHO, G.D.; PELEGRINI, R. **Tratamento de efluentes de matadouros e frigoríficos**. In:III Fórum de Estudos Contábeis.São Paulo: Faculdades Integradas Claretianas, 2003.

SCOARIS, D. D. O.; BIZERRA, F. C.; YAMADA-OGATTA, S. F.; ABREU FILHO, B. A. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. The occurrence of *Aeromonas* spp. in the bottled mineral water, well water and tap water from the municipal supplies. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 1049-1055, 2008.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K. E.; PULS, M.; EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n.1-4, p. 166-170, 2006.

SENA R. F. Avaliação da biomassa obtida pela otimização da flotação de efluentes da indústria de carnes para geração de energia. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

SERIKOVNA, S. Z.; SERIKOVICH, K. S.; SAKENOVNA, A. S.; MURZAKHMETOVICH, S. S.; KHAMITOVICH, A. K. Screening of lipid degrading microorganisms for wastewater treatment. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 219-226, 2013.

SHARMA, P.; SHARMA, N.; PATHANIA, S.; HANDA, S. Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 369-377, 2017.

SHENG, Y.; CAO, H.; LI, Y.; ZHANG, Y. Effects of various pretreatments on biological sulfate reduction with waste activated sludge as electron donor and waste activated sludge diminution under biosulfidogenic condition. **Journal of hazardous materials**, v. 179, n. 1-3, p. 918-925, 2010.

SHUKLA, B.N. DESAI, P.V. Isolation, characterization and optimization of lipase producing *Pseudomonas* spp. from oil contaminated sites. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n.5, p.902-909, 2016.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. **Antonine van Leeuwenhoeck**, v.28, n.1, p. 15-22, 1957.

SILVA, M. O. M. B.; BISPO, D. F.; PAGANO, R. L.; SILVA, A. S.; SANTOS, E. J.; SILVA, C. F. Isolamento de microrganismos e estudo da produção de lipase utilizando resíduos agroindustriais. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 12, n. 05, p. 1-9. mai. 2016.

SILVA-BEDOYA, L. M.; SÁNCHEZ-PINZÓN, M. S.; CADAVID-RESTREPO, G. E.; MORENO-HERRERA, C. X. Bacterial community analysis of an industrial wastewater treatment plant in Colombia with screening for lipid-degrading microorganisms. **Microbiological research**, v. 192, p. 313-325, 2016.

SINGH, G.; CAPALASH, N.; KAUR, K.; PURI, S.; SHARMA, P. Enzymes: applications in pulp and paper industry. **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. p. 157-172, 2016.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P.K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SOLEYMANI, S.; ALIZADEH, H.; MOHAMMADIAN, H.; RABBANI, E.; MOAZEN, F.; SADEGUI, H. M.; SHARIAT, S.Z.; ETEMADIFAR, Z.; RABBANI, M. Efficient Media for High Lipase Production: One Variable at a Time Approach. **Avicenna Journal Of Medical Biotechnology**, Iran, v. 9, n. 2, p.82-86, 2017.

SONUNE, N.; GARODE, A. Isolation, characterization and identification of extracellular enzyme producer *Bacillus licheniformis* from municipal wastewater and evaluation of their biodegradability. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 37-44, 2018.

SREEMOYEE, C.; PRITI, P. Assessment of physico-chemical parameters of dairy waste water and isolation and characterization of bacterial strains in terms of cod reduction. **Int J Sci**, v. 2, n. 3, p. 395-400, 2013.

SUCI, M.; ARBIANTI, R.; HERMANSYAH, H. Lipase production from *Bacillus subtilis* with submerged fermentation using waste cooking oil. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v.105, n.1, p.1-6, 2018.

SUEHARA, K.; KAWKMOTO, Y.; FUJII, E. KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, EUA, v. 100, n. 4, p. 437-442, 2005.

TACIN, M. V.; MASSI, F. P.; FUNGARO, M. H. P.; TEIXEIRA, M. F. S.; DE PAULA, A. V.; DE CARVALHO SANTOS-EBINUMA, V. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 369-378, 2019.

TANG, H. L.; XIE, Y. F.; CHEN, Y. C. Use of Bio-Amp, a commercial bio-additive for the treatment of grease trap wastewater containing fat, oil, and grease. **Bioresource technology**, v. 124, p. 52-58, 2012.

TEIXEIRA, J. C.; HESPANHOL, A. N. A trajetória da pecuária bovina brasileira. **Caderno Prudentino de Geografia**, v. 1, n. 36, p. 26-38, 2014.

TIGERSTROM, R.G. V.; STELMASCHUK, S. The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. **Canadian journal of microbiology**, v. 35, n. 4, p. 511-514, 1989.

TORKIAN A.; EQBALI A.; HASHEMIAN, S.J. The effect of organic loading rate on the performance of UASB reactor treating slaughterhouse effluent. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2003.

TRIPATHI, N.; CHOUDHARY, A.; RAWAT, R. Optimization and purification of lipase production by aeromonas hydrophila. **International Journal Of Recent Trends In Science And Technology**, p.304-306, 2018.

TRIPATHI, R.; SINGH, J.; BHARTI, R.K.; THAKUR, I.S. Isolation, purification and characterization of lipase from Microbacterium sp. and its application in biodiesel production. **Energy Procedia**, v. 54, p. 518-529, 2014.

TZIRITA, M.; PAPANIKOLAOU, S.; QUILTY, B. Degradation of fat by a bioaugmentation product comprising of Bacillus spp. before and after the addition of a Pseudomonas sp. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, n. 2, p. 1700264, 2018.

TZIRITA, M.; PAPANIKOLAOU, S.; QUILTY, B. Enhanced fat degradation following the addition of a Pseudomonas species to a bioaugmentation product used in grease traps. **Journal of Environmental Sciences**, v. 77, p. 174-188, 2019.

UTTATREE, S.; WINAYANUWATTIKUN, P.; CHAROENPANICH, J. Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from Acinetobacter baylyi. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 5, p. 1362-1376, 2010.

VALENTE, A. M.; ALEXANDRE, V. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 483-488, 2010.

VALLADÃO A. B. G.; FREIRE D. M. G.; CAMMAROTA M. C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 4, p. 219-225, 2007.

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

VEERAPAGU, M.; NARAYANAN, A. S.; PONMURUGAN, K.; JEYA, K. R. Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. **Asian J. Pharm. Clin. Res**, v. 6, n. 3, p. 62-67, 2013.

VERMA, S.; SAXENA, J.; PRASANNA, R.; SHARMA, V.; NAIN, L. Medium optimization for a novel crude-oil degrading lipase from *Pseudomonas aeruginosa* SL-72 using statistical approaches for bioremediation of crude-oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 321-329, 2012.

VIEIRA, T. M.; SILVA, E. P.; FILHO, N. R. A.; VIEIRA, J. D. G. Determinação e quantificação da degradação bacteriana de biodiesel de óleo de palma. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, Brasília, DF, 2006. **Anais...** Brasília, DF: Prossiga/IBICT, 2006. p. 218-223.

VIDA, M.; S. AKBAR.; G. ZAHRA. Biodegradation of effluents from dairy plant by bacterial isolates. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)**, v. 26, n. 1, p. 55-59, 2007.

VISHNUPRIYA, B.; SUNDARAMOORTHY, C.; KALAIVANI, M.; SELVAM, K. PRODUCTION of lipase from *Streptomyces griseus* and evaluation of Bioparameters. **International journal of chemtech research**, v. 2, n. 3, p. 1380-1383, 2010.

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

WOO P.C.Y.; LAU S.K.P.; TENG J.L.L.; TSE H, YUEN K.Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

YADAV, S.; VERMA, D. K.; PRADHAN, P. K.; DOBRIYAL, A. K.; SOOD, N. Phenotypic and genotypic identification of *Aeromonas* species from aquatic environment. **International Journal of Aquatic Science**, v. 5, n. 1, p. 13-20, 2014.

YASIN, N. H. M.; MUMTAZ, T.; HASSAN, M. A. Food waste and food processing waste for biohydrogen production: a review. **Journal of environmental management**, v. 130, p. 375-385, 2013.

YASIN, N. H. M.; SANCHEZ-TORRES, V.; MAEDA, T. Enhanced reduction of waste activated sludge at a low temperature by locally isolated strains *Pseudomonas* sp. VNT and *Aeromonas* sp. VNT. **Bioresource technology**, v. 174, p. 134-141, 2014.

YOUNG J.P.; DOWNER H.L.; EARDLY B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **J Appl Bacteriol**, v. 173, p. 2271-2277, 1991.

APÊNDICE

TABELA 1 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS DE ATIVIDADE LIPOLÍTICA PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			Atividade lipolítica (U mL ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	0,25±0,00	0,37±0,04	0,77±0,05	0,97±0,00
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	0,33±0,00	0,16±0,00	0,77±0,05	1,11±0,05
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	0,05±0,00	0,00±0,05	0,53±0,05	0,77±0,10
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	0,02±0,02	0,00±0,00	0,53±0,05	0,73±0,00
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	0,25±0,00	0,25±0,00	0,68±0,05	0,87±0,10
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	0,22±0,02	0,29±0,04	0,51±0,02	1,11±0,05
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	0,00±0,02	0,07±0,00	0,48±0,00	0,82±0,05
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	0,05±0,05	0,00±0,05	0,48±0,10	0,68±0,00
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,30±0,00	0,30±0,05	0,15±0,00	0,35±0,00
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,15±0,05	0,10±0,05	0,40±0,00	0,40±0,05
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	0,10±0,00	0,05±0,05	0,73±0,00	0,65±0,02
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	0,10±0,00	0,48±0,05	0,63±0,05	0,53±0,05
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	0,10±0,00	0,15±0,00	0,20±0,00	0,35±0,00
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	0,15±0,05	0,00±0,00	0,15±0,05	0,30±0,05
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,39±0,05	0,70±0,00	0,63±0,00	1,00±0,00
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,39±0,05	0,22±0,00	0,82±0,00	1,10±0,10
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	0,24±0,00	0,31±0,10	0,87±0,05	0,95±0,05

TABELA 2 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM RESULTADOS QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE DQO PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			DQO (mg L ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0	30,0	10,0	8920,0±50,0	8436,7±0,0	9086,7±483,3	7153,3±316,7
2	7,0	30,0	20,0	8686,7±50,0	8970,0±66,7	9453,3±50,0	5793,3±66,7
3	7,0	40,0	10,0	5686,7±300,0	5726,7±266,7	4626,7±33,3	3626,7±0,0
4	7,0	40,0	20,0	6586,7±733,3	5426,7±33,3	5160,0±0,0	4510,0±183,3
5	8,0	30,0	10,0	8903,3±33,3	9103,3±100,0	10103,3±33,3	6376,7±16,7
6	8,0	30,0	20,0	9020,0±16,7	9036,7±33,3	9336,7±0,0	6610,0±16,7
7	8,0	40,0	10,0	6553,3±166,7	5276,7±183,3	4143,3±183,3	3260,0±66,7
8	8,0	40,0	20,0	6020,0±33,3	5576,7±16,7	3826,7±33,3	2860,0±200,0
9	6,7	35,0	15,0	8793,3±66,7	8450,0±50,0	8666,7±33,3	8533,3±66,7
10	8,3	35,0	15,0	8776,7±50,0	7666,7±0,0	7955,6±88,9	8716,7±16,7
11	7,5	26,6	15,0	8176,7±50,0	7826,7±100,0	7476,7±16,7	5993,3±200,0
12	7,5	43,4	15,0	8393,3±0,0	8893,3±133,3	8493,3±300,0	8043,3±116,7
13	7,5	35,0	6,60	8643,3±16,7	8733,3±33,3	8866,7±33,3	8733,3±0,0
14	7,5	35,0	23,4	9076,7±16,7	8100,0±66,7	9016,7±83,3	7966,7±100,0
15	7,5	35,0	15,0	8743,3±16,7	8743,3±16,7	8410,0±50,0	8350,0±383,3
16	7,5	35,0	15,0	8793,3±0,0	8810,0±50,0	8343,3±16,7	8144,4±311,1
17	7,5	35,0	15,0	8926,7±33,3	8793,3±0,0	8360,0±33,3	8811,1±22,2

TABELA 3 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM RESULTADOS QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE O&G PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			Óleos e Graxas (mg L ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0	30,0	10,0	3360,0±40,0	1120,0±13,3	1913,3±113,3	713,3±6,7
2	7,0	30,0	20,0	3213,3±226,7	1740,0±86,7	1386,7±80,0	1540,0±6,7
3	7,0	40,0	10,0	2213,3±40,0	1453,3±0,0	1993,3±140,0	1046,7±73,3
4	7,0	40,0	20,0	2113,3±73,3	1846,7±20,0	2046,7±33,3	1580,0±60,0
5	8,0	30,0	10,0	2860,0±33,3	1713,3±33,3	2300,0±86,7	2193,3±6,7
6	8,0	30,0	20,0	2533,3±13,3	2680,0±106,7	1766,7±33,3	1920,0±66,7
7	8,0	40,0	10,0	1740,0±273,3	1513,3±6,7	1686,7±60,0	1453,3±120,0
8	8,0	40,0	20,0	1373,3±26,7	1280,0±80,0	1293,3±213,3	1073,3±6,7
9	6,7	35,0	15,0	2193,3±73,3	1800,0±40,0	1313,3±13,3	1140,0±20,0
10	8,3	35,0	15,0	2093,3±173,3	2066,7±106,7	1566,7±60,0	1120,0±106,7
11	7,5	26,6	15,0	2440,0±66,7	2246,7±20,0	2486,7±46,7	1873,3±126,7
12	7,5	43,4	15,0	2866,7±40,0	2153,3±6,7	1713,3±20,0	1733,3±200,0
13	7,5	35,0	6,60	2560,0±186,7	2313,3±6,7	1426,7±13,3	1260,0±60,0
14	7,5	35,0	23,4	2806,7±46,7	2506,7±106,7	1606,7±60,0	1273,3±33,3
15	7,5	35,0	15,0	2926,7±20,0	2106,7±93,3	1633,3±46,7	1226,7±0,0
16	7,5	35,0	15,0	3273,3±26,7	2486,7±46,7	1666,7±26,7	1366,7±46,7
17	7,5	35,0	15,0	2600,0±66,7	2153,3±20,0	2273,3±46,7	693,3±40,0

TABELA 4 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM RESULTADOS QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			Ácidos Graxos Livres (µmol mL ⁻¹)			
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	24 h	48 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	8,08±0,25	15,68±1,96	27,84±0,98	31,32±0,58
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	8,57±0,25	15,19±0,49	20,88±0,00	33,64±0,00
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	5,80±0,00	7,54±0,49	20,88±0,00	22,91±0,00
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	5,80±0,00	8,99±0,49	20,88±0,00	22,04±0,49
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	8,82±0,00	17,64±0,25	20,88±0,00	32,48±0,19
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	8,82±0,00	17,15±0,98	26,10±0,00	31,32±0,00
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	6,67±0,00	8,12±0,49	20,30±0,49	21,17±1,16
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	6,96±0,25	8,41±0,00	18,56±1,47	20,88±0,11
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	11,40±0,00	13,50±0,25	21,00±0,00	29,40±0,18
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	12,60±0,60	13,80±0,30	22,20±0,60	29,40±0,60
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	12,18±0,60	20,88±0,60	22,62±0,60	26,68±0,60
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	12,76±0,49	23,78±0,00	27,26±3,43	31,32±6,08
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	11,40±0,00	18,00±0,49	20,40±0,49	24,00±1,44
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	12,00±0,60	15,00±0,00	21,90±1,20	27,00±0,00
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	11,02±0,00	23,20±0,60	26,10±0,30	32,40±0,60
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	10,73±0,25	20,88±0,98	23,20±0,00	30,60±0,60
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	10,44±0,00	19,72±0,00	22,04±0,00	31,20±0,00

TABELA 5– DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM RESULTADOS QUANTO A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA SOLÚVEL PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			Proteína Solúvel (mg L ⁻¹)	
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	0 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	5668,28±100,39	543,37±15,94
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	5790,45±42,94	558,03±23,77
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	3904,12±149,51	398,23±13,19
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	4207,11±190,15	661,14±16,77
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	6264,48±62,20	585,40±9,80
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	6826,47±27,64	512,58±10,80
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	5536,33±96,01	643,55±10,46
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	4651,81±11,97	506,72±1,83
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	6103,21±29,32	499,39±5,86
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	5663,39±14,66	469,58±6,33
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	6198,50±21,99	512,58±12,29
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	5186,92±65,97	495,97±11,50
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	6315,79±124,62	489,62±2,49
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	5311,54±158,35	526,76±8,29
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	6758,05±59,05	570,25±55,66
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	6997,51±29,32	521,87±9,68
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	7166,10±95,29	480,82±14,63

TABELA 6– DELINEAMENTO EXPERIMENTAL COM RESULTADOS DE PH PARA OS ENSAIOS CONTROLE.

Ensaio	Variáveis			pH		
	pH	T (°C)	Inóculo (%)	24 h	48 h	72 h
1	7,0 (-1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	7,47	7,67	7,90
2	7,0 (-1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	7,20	8,38	8,06
3	7,0 (-1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	7,26	7,93	8,18
4	7,0 (-1)	40,0 (1)	20,0 (1)	7,31	7,65	7,60
5	8,0 (1)	30,0 (-1)	10,0 (-1)	7,30	7,43	7,88
6	8,0 (1)	30,0 (-1)	20,0 (1)	7,45	7,42	8,36
7	8,0 (1)	40,0 (1)	10,0 (-1)	7,81	7,46	7,94
8	8,0 (1)	40,0 (1)	20,0 (1)	7,42	7,37	8,06
9	6,7 (-1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	6,81	7,05	7,34
10	8,3 (1,68)	35,0 (0)	15,0 (0)	7,05	7,31	7,35
11	7,5 (0)	26,6 (-1,68)	15,0 (0)	7,30	7,52	7,75
12	7,5 (0)	43,4 (1,68)	15,0 (0)	7,15	7,29	7,57
13	7,5 (0)	35,0 (0)	6,60 (-1,68)	6,78	7,11	7,32
14	7,5 (0)	35,0 (0)	23,4 (1,68)	7,05	7,18	7,40
15	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	7,11	7,29	7,42
16	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	7,00	7,05	7,57
17	7,5 (0)	35,0 (0)	15,0 (0)	7,00	7,32	7,61