



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA DEPARTAMENTO DE
TECNOLOGIA E CIÊNCIAS SOCIAIS – DTCS CAMPUS III –
JUAZEIRO**

**COLEGIADO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E
BIOTECNOLOGIA**

**LINHAGENS FÚNGICAS ISOLADAS DE RESÍDUOS DA
INDÚSTRIA DE SORVETES COM POTENCIAL PARA
PRODUÇÃO DE LIPASES**

Discente: BIANCA LIRA SARAIVA

Orientadora: GABRIELA MACÊDO ARETAKIS DE ALMEIDA

JUAZEIRO-BA

JULHO, 2024

BIANCA LIRA SARAIVA

**LINHAGENS FÚNGICAS ISOLADAS DE RESÍDUOS DA
INDÚSTRIA DE SORVETES COM POTENCIAL PARA
PRODUÇÃO DE LIPASES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade do Estado da Bahia – UNEB Campus III, como requisito parcial para avaliação da disciplina de Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Macêdo Aretakis de Almeida.

JUAZEIRO-BA

JULHO, 2024

BIANCA LIRA SARAIVA

**LINHAGENS FÚNGICAS ISOLADAS DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE
SORVETES COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE LIPASES**

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, pelo Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Campus III, da Universidade do Estado da Bahia.

Aprovado em 04/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



GABRIELA MACEDO ARETAKIS DE ALMEIDA

Data: 05/09/2024 14:05:13-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Gabriela Macêdo Aretakis de Almeida
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Documento assinado digitalmente



SARA SAMANTA DA SILVA BRITO

Data: 04/09/2024 13:27:28-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Sara Samanta da Silva Brito
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Documento assinado digitalmente



LUANA PEREIRA GONCALVES

Data: 05/09/2024 13:54:16-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Luana Pereira Gonçalves
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Juazeiro – BA

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por minha vida, por nunca ter deixado faltar força e perseverança, por sua infinita bondade e a permissão de chegar até aqui. Costumo dizer que sou uma, mas não sou só, carrego comigo mais de muitos, e a eles, devo também, minha imensa gratidão. Minha mãe, por ser minha base, minha melhor amiga e fiel escudeira, ela foi e sempre será minha maior fonte de inspiração, pois mulher mais guerreira e forte que ela, não há, e se hoje cheguei até aqui, devo muito a melhor mãe do mundo, a minha.

Este trabalho só foi possível devido minha ilustre orientadora, Gabriela Macedo, com sua paciência, amor e dedicação e os meus colegas de trabalho Sandy e David, que foram fonte de companheirismo e alegria. A minha família, amigos e agregados, deixo aqui, meu muito obrigado, vocês foram luz na minha vida, me apoiaram de uma forma sem igual, deixando minha rotina mais leve.

Ao meu namorado por ser meu alicerce, pela sua cumplicidade durante todos esses dias de TCC e por sempre me amparar em todos os momentos delicados da minha vida e a sua família por ter me abraçado como se fosse filha.

RESUMO

As lipases são classificadas como hidrolases (EC 3.1.1.3), e agem sobre ligações éster de ácidos carboxílicos. Estas enzimas apresentam diversas aplicações biotecnológicas, em áreas como a indústria de alimentos, bem como no tratamento de efluentes industriais gordurosos. Diante de sua utilidade, nota-se a importância da realização de pesquisas que busquem novos ambientes para *screening* de microrganismos produtores destas moléculas. Este trabalho objetivou isolar linhagens fúngicas com potencial para produção de lipases em efluentes da indústria de sorvetes. As linhagens foram isoladas de diferentes etapas de tratamento da estação de tratamento de efluentes (ETE) de uma indústria de sorvetes. Para desenvolvimento da bioprospecção, foi realizada a diluição do resíduo, isolamento, purificação de colônias, descrição morfológica e por fim a triagem de microrganismos produtores de lipase. Para o isolamento foram utilizados quatro meios de cultura, sendo eles Batata dextrose ágar (BDA), meio BDA enriquecido com azeite, BDA enriquecido com meio comercial em diferentes proporções, sendo elas 10% e 25%. Ao final da bioprospecção, foram isoladas 14 linhagens fúngicas. O potencial enzimático para produção de lipases foi determinado pelo índice enzimático. Após medição do índice enzimático, foram obtidos oito isolados com o potencial de produção de lipases para aplicação industrial. O maior potencial observado, foi do isolado morfotipo 2, pois apresentou o maior índice enzimático.

Palavras-chave: Microbiologia, Efluentes gordurosos, Tratamento biológico, Produção verde, Microcultivo.

ABSTRACT

Lipases are classified as hydrolases (EC 3.1.1.3), and act on ester bonds of carboxylic acids. These enzymes have several biotechnological applications, in areas such as the food industry, as well as in the treatment of fatty industrial effluents. Given its usefulness, the importance of carrying out research that seeks new environments for screening microorganisms that produce these molecules is noted. This work aimed to isolate fungal strains with potential for producing lipases in effluents from the ice cream industry. The strains were isolated from different treatment stages of the effluent treatment plant (ETE) of an ice cream industry. To develop bioprospecting, residue dilution, isolation, colony purification, morphological description and finally screening of lipase-producing microorganisms were carried out. For isolation, four culture media were used, namely Potato dextrose agar (BDA), PDA medium enriched with olive oil, PDA enriched with commercial medium in different proportions, 10% and 25%. At the end of bioprospecting, 14 fungal strains were isolated. The enzymatic potential for lipase production was determined by the enzymatic index. After measuring the enzymatic index, eight isolates with the potential to produce lipases for industrial application were obtained. The greatest potential observed was from the morphotype 2 isolate, as it presented the highest enzymatic index.

Keywords: Microbiology, Fatty effluents, Biological treatment, Green production, Microculture.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1 PRODUÇÃO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE SORVETES	8
2.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE SORVETES.....	10
2.3 LIPASES	11
3. METODOLOGIA.....	12
3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE SORVETE	12
3.2 DILUIÇÃO DO EFLUENTE PARA BIOPROSPECÇÃO	12
3.3. BIOPROSPECÇÃO E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	13
3.4 OBTENÇÃO DAS COLÔNIAS PURAS	14
3.5. LINHAGENS FÚNGICAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE LIPASES	14
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS E OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA	15
4.2. DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ÍNDICE ENZIMÁTICO PARA LIPASE.....	18
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
6. REFERÊNCIAS	23

1.INTRODUÇÃO

No ano de 2022, a quantidade de leite produzida no território brasileiro atingiu a marca de 34,6 bilhões de litros, colocando o país como o quarto maior produtor mundial, o que impacta positivamente no progresso social e econômico nacional. (IBGE, 2022). No entanto, o setor de laticínios tem se destacado também na produção de resíduos líquidos e despejo de efluentes, que pode ser lançado sem tratamento adequado nos corpos receptores. (SOUZA, 2022). Considerando os impactos que os resíduos podem causar no ambiente, o interesse de algumas indústrias em relação aos problemas ambientais vem crescendo cada vez mais. (GONÇALVES, 2020). A elevada concentração de triacilgliceróis presentes nos efluentes destas indústrias, faz com que estes necessitem de tratamentos especiais para redução de sua carga potencialmente poluidora.

Diante deste cenário, têm sido buscadas alternativas de tratamentos para os efluentes da indústria de laticínios e sorvetes. Entre as alternativas, o reaproveitamento dos resíduos nesse segmento pode contribuir positivamente para minimizar os problemas ambientais e energéticos, uma vez que estes resíduos têm potencial para gerar bioprodutos com diferentes aplicações industriais. (LUCAS et al., 2019). Uma alternativa biotecnológica é a produção e utilização de enzimas como as lipases que podem construir uma rota verde para a degradação dos compostos presentes em efluentes devido à sua versatilidade. (OLIVEIRA, et al., 2014; DE SOUZA, 2019).

As lipases são enzimas que participam da hidrólise de óleos e gorduras reduzindo a quantidade de lipídeos nos efluentes, melhorando assim a qualidade destes resíduos. Estas enzimas podem ser de origem animal, de vegetal ou de microrganismos, sendo as lipases fúngicas as que vêm adquirindo maior destaque, uma vez que são excretadas para o meio extracelular, o que facilita sua recuperação do meio de cultivo. (COLLA et al., 2012; SHARMA et al., 2014). Estas enzimas são eficientes para a catálise parcial ou total dos triacilgliceróis (TAG), podendo ser aplicadas em diversos segmentos industriais (COLLA et al., 2016). Diante do exposto, esta pesquisa tem como objetivo realizar a bioprospecção de linhagens fúngicas em efluentes da indústria de sorvetes com potencial para produção de lipases.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PRODUÇÃO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE SORVETES

Estima-se que a indústria de sorvetes movimenta US\$ 73,8 bilhões em vendas

mundialmente, com uma perspectiva de crescimento em torno de 10% ao ano em países como o Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Indústrias de Sorvetes. (RIBEIRO,2020). O sorvete possui uma composição diversificada, com aproximadamente 20% de gordura, 8 a 15% de sólidos não gordurosos do leite, 13% de açúcar e 0 a 0,7% de emulsificante-estabilizante, podendo haver variabilidade de acordo com a região e em diferentes mercados. (SOUZA et al., 2010). Todos os ingredientes apresentam papel essencial nas características do produto, sendo que a gordura do leite representa o ingrediente mais importante na qualidade do sorvete e o primeiro a ser estimado na composição do produto. (QUEIROZ et al., 2009).

Na produção de sorvete ocorrem etapas para processar o leite juntamente com os demais ingredientes presentes na composição. Ao longo do processamento, é realizada uma padronização nas etapas do processo produtivo. Após a padronização, ocorre a mistura e, logo em seguida, ocorrem as etapas de pasteurização e homogeneização, para que haja fabricação do produto final, o sorvete, que seguirá para o envase.

Ao final do processo produtivo, deve ser realizada a higienização dos equipamentos, bem como o descarte dos resíduos e efluentes gerados ao longo do processo. Estes resíduos e efluentes geralmente necessitam de tratamento, e podem ser encaminhados para estações de tratamento de efluentes.

A composição destes efluentes geralmente inclui; proteínas, carboidratos, principalmente lactose; gorduras, sólidos suspensos, nitrogênio e fósforo. (SANSOLDO, 2019). Os sólidos suspensos são derivados de coágulos de leite, que correspondem a 90% da quantidade de gorduras totais do efluente. A presença dos macronutrientes é influenciada por outros constituintes, bem como a presença de nitrogênio que está relacionada com a alta concentração de proteínas, enquanto o fósforo é proveniente do uso de ácido fosfórico e detergentes na lavagem de instalações. Além disso, dependendo da linha produtiva e disponibilidade de insumos, pode estar incorporado nos efluentes pedaços de frutas, essências, condimentos diversos e subprodutos como o soro. Dessa forma, percebe-se que as características físico- químicas do resíduo gerado são variáveis de acordo com cada produção e sabor de sorvete, sendo de grande importância conhecer suas características para assim realizar o tratamento adequado. (KARADAG et al., 2014).

Na estação de tratamento da indústria de sorvetes, a elevada concentração de triacilgliceróis necessita inicialmente ser hidrolisada para, em seguida, ser transformada em fonte de carbono para microrganismos e, posteriormente, ser convertido em lodo ativado na

estação de tratamento. (DIAS et al., 2021).

Sendo assim, a produção de laticínios gera detritos sólidos, líquidos e emissões de ar que têm o potencial de prejudicar o meio ambiente. Não importa o tamanho ou o nível de poluição da indústria, as leis ambientais exigem que todas as empresas cuidem adequadamente de seus resíduos. (BUSS, 2014).

2.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE SORVETES.

De acordo com a norma brasileira ABNT – NBR 9800/1987, efluentes industriais são “resíduos provenientes de processos produtivos, águas de lavagem provenientes de atividades de limpeza e produtos industriais atualmente utilizados ou produzidos pelas empresas”. A legislação sobre resíduos industriais é importante porque determina como as empresas lidam com os resíduos que geram. Esses resíduos podem causar danos ao meio ambiente se não forem descartados adequadamente, por isso existem leis que exigem que as empresas sigam padrões de tratamento e controle de água.

As altas variabilidades das águas residuais tornam, difícil selecionar uma opção eficaz de tratamento, que pode variar entre tratamentos químicos, físicos ou biológicos. (DE SOUZA et al., 2021). De modo geral, o tratamento convencional consiste em quatro fases. Começa com o pré-tratamento para remover resíduos brutos; isto é seguido por tratamento primário para remover sólidos, óleos e gorduras presentes; depois tratamento secundário para remover matéria orgânica e nutrientes (nitrogênio e fósforo) e, em alguns casos, tratamento terciário para fornecer polimento ao resíduo tratado. (AL-SHAMMARI et al., 2015). Todas essas etapas são formadas por meio de uma combinação de métodos físicos, químicos e biológicos com o objetivo de adequar os efluentes aos padrões de lançamento prescritos na legislação. (CONAMA, 2005), garantindo a proteção do meio ambiente.

Um dos objetivos do tratamento biológico é retirar a matéria orgânica (carboidratos, proteínas e lipídios) do efluente por meio de reações bioquímicas realizadas por microrganismos. Esses microrganismos convertem a matéria orgânica em dióxido de carbono, água e material celular. Essa decomposição biológica do material orgânico necessita de condições ambientais favoráveis, como temperatura, pH e concentração, além da presença ou ausência de oxigênio no meio, o que classifica o processo como aeróbio ou anaeróbio, respectivamente. (METCALF et al., 2015). Nos processos aeróbios, a estabilização dos dejetos é realizada por microrganismos, geralmente bactérias aeróbias e facultativas.

Dentre os tratamentos biológicos para efluentes gordurosos, o uso de enzimas lipolíticas, tem sido um tratamento biológico viável, que envolve um pré-tratamento no efluente para diminuir a quantidade de óleos e gorduras, facilitando a ação microbiana durante o tratamento biológico. (VALENTE et al., 2010). Deve-se levar em consideração que os lipídios são predominantemente encontrados como triglicerídeos, enquanto uma pequena porção se apresenta como ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). Em efluentes com níveis elevados de triglicerídeos, é necessário hidrolisar tais moléculas e convertê-las em fonte de carbono para os fungos durante o processo de tratamento biológico, conforme mencionado por Mendes (2005).

2.3 LIPASES

Enzimas são catalisadores altamente específicos e extremamente eficientes. Elas têm a capacidade de degradar seletivamente um composto, sem afetar os demais componentes do efluente. (MUGDHA et al., 2012). Por essa razão, o tratamento enzimático pode ser aplicado em efluentes com diferentes concentrações de poluentes. Vale ressaltar que as enzimas têm algumas vantagens em relação aos catalisadores regulares, como aqueles contendo elementos como cobre e níquel. (MUGDHA et al., 2012). Isso ocorre devido ao fato de que elas operam em condições menos restritas de pH e temperatura e, do ponto de vista ambiental, são mais aceitáveis por serem biodegradáveis.

Atualmente são conhecidas mais de 4000 enzimas, sendo em torno de 200 delas destinadas para uso comercial e produzidas por microrganismos. (CAIXETA,2019). As lipases, por sua vez, formam o terceiro maior grupo em vendas mundialmente. (GARRIDO et al., 2018)

As enzimas podem ser empregadas em diferentes áreas e setores industriais, havendo um potencial relacionado à diminuição dos custos de produção. Para isso, estratégias como isolamento e identificação de novos microrganismos produtores de enzimas mostram-se extremamente relevantes. (REINEHR et al., 2014). Entre as enzimas com interesse e aplicação nos diversos setores industriais, como para o tratamento de efluentes, as lipases são habitualmente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de tecidos animais, vegetais e de microrganismos. As lipases microbianas são mais usadas industrialmente devido às características como estabilidade e variedade de atividade catalítica. (DOS SANTOS, 2020).

Mais da metade das enzimas industriais são produzidas por leveduras e fungos filamentosos e cerca de 30% por bactérias. Apenas 8% são produzidos por animais e 4% por plantas. A aplicação industrial de enzimas foi possível graças aos esforços iniciais de Jokichi Takamine (1894, 1914) e Boidin e Effront (1917), que cultivaram enzimas de fungos e bactérias, respectivamente, em escala industrial. Estas fontes são economicamente vantajosas porque o seu simples cultivo não envolve qualquer limitação em termos de tempo e espaço em comparação com outras fontes.

Tecnologias avançadas permitem sequenciar os genomas dos microrganismos de forma muito eficiente e identificar muitas novas sequências genéticas que codificam variantes enzimáticas. (SRIVASTAVA, 2019). De forma geral, observa-se que estudos focados na produção de lipases fúngicas com fungos filamentosos têm apresentado resultados bastante promissores, onde os gêneros mais estudados são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Thermomyces*. O principal interesse das lipases de fungos filamentosos é o seu caráter extracelular, o que reduz significativamente o custo total dos processos biocatalisados por essas enzimas e as torna mais interessantes, do ponto de vista industrial, do que as lipases bacterianas. (ZAVARISE & PINOTTI, 2019).

3. METODOLOGIA

3.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE DA INDÚSTRIA DE SORVETE

O efluente foi coletado na estação de tratamento de efluentes (ETE) de uma indústria de produção de sorvetes na cidade de Petrolina-PE. A coleta foi realizada, em três pontos da ETE, sendo eles, a entrada do efluente, o local de adensamento do lodo e a saída do efluente. As amostras foram acondicionadas em vidros específicos e escuros para evitar danos e mudança na natureza do resíduo. Estes foram levados para o Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LBM) do Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais (DTCS – Campus III) da Universidade Estado da Bahia, onde foram mantidos a 4°C. Os parâmetros de pH e a temperatura foram mensurados no momento de coleta para serem mantidos durante o desenvolvimento do trabalho. Suas condições apresentaram variações em uma faixa de pH de 5 a 9, sendo favoráveis para o crescimento de fungos. A temperatura nos locais de coleta variou entre 23°C e 35°C

3.2 DILUIÇÃO DO EFLUENTE PARA BIOPROSPECÇÃO

O material coletado, foi diluído em série em solução salina, utilizando a proporção de 100mL de água destilada autoclavada para 0,9g de NaCl (Cloreto de sódio). Foram testadas

diluições até 10^{-3} visando encontrar a mais adequada para o processo de bioprospecção como indicado na literatura por Clark (1995).

3.3. BIOPROSPECÇÃO E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

O isolamento dos microrganismos foi realizado através da semeadura direta do efluente diluído em placas de petri contendo diferentes meios de cultivo, sendo: o meio contendo ágar, batata e dextrose (BDA), o meio BDA enriquecido com azeite a 2%, e o meio BDA enriquecido com meio comercial em duas proporções, 10 % e 20%. Em todos os meios foram adicionados 0,5g/L de antibiótico para evitar o crescimento bacteriano (Tabela 1). Nas placas de petri, foram inoculados 0,3 mL das amostras de efluente diluídas a 10^{-2} , a melhor diluição identificada para detecção de fungos no efluente, realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky.

No total, foram utilizados quatro meios de cultura diferentes, com 5 repetições, para cada amostra de efluente obtida (entrada, adensamento do lodo e saída). As placas foram incubadas a 30 °C durante 7 dias. A sequência do isolamento foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias. (RIBEIRO; SOARES, 2001). Dessa maneira foi realizado o plaqueamento do resíduo em placas de petri com diferentes meios de cultivo, para posteriormente seguir com a purificação de colônias, até obter placas puras de cada morfotipo encontrado no resíduo.

Tabela 1. Componentes dos meios de culturas utilizados para o isolamento fúngico durante o processo de bioprospecção realizado com o efluente da indústria de sorvetes, Petrolina-PE, Nordeste do Brasil. *, Ausente.

Componentes	Meio BDA	Meio BDA + Azeite	Comercial	Comercial
Batata	200g	200g	200g	200g
Sacarose	20g	20g	20g	20g
Agar	10g	10g	10g	10g
Água	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL
Azeite	*	2%	*	*
Formulação comercial	*	*	10%	20%

Fonte: Autora, 2024.

3.4 OBTENÇÃO DAS COLÔNIAS PURAS

Após a bioprospecção, foi realizado o plaqueamento de todas as colônias em meio BDA e foram armazenadas dentro da B.O.D, sob as mesmas condições, durante 7 dias. As colônias foram visualizadas no microscópio óptico para observação de suas características morfológicas. Para maior tempo de conservação dos isolados fúngicos, estes foram conservados pelo método descrito por Castellani (1931).

3.5. LINHAGENS FÚNGICAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE LIPASES

Para detecção das linhagens fúngicas produtoras de lipases, foi realizado um novo plaqueamento, visando garantir o metabolismo ativo dos microrganismos previamente isolados e realizar o ajuste da concentração de esporos para todos os morfotipos isolados. Inicialmente, foi realizado o plaqueamento de um disco de micélio em meio BDA. Após crescimento das colônias, foram adicionados 10mL de água destilada e autoclavada, para realização de raspagem nas placas. O líquido obtido, contendo os esporos, foi armazenado em tubos eppendorf, a 4 °C. A contagem de esporos foi realizada com auxílio de uma Câmara de Neubauer, metodologia proposta por Vicinni (2004), em triplicata com auxílio do microscópio óptico e do programa Image J. Posterior a essa etapa, foi estabelecido o ajuste de concentração para 10^6 , através da fórmula $C1.V1=C2.V2$, onde cada morfotipo teve sua concentração padronizada.

Os isolados obtidos na bioprospecção foram inoculados em placas de Petri contendo meio diferencial para detecção de atividade enzimática, com azeite (2%), e com a gordura vegetal utilizada pela indústria de sorvetes selecionada nesta pesquisa (2%) (Tabela 2). As placas inoculadas foram incubadas a 28°C durante 48 horas, com 100uL de amostra distribuídos no meio de cultura. Para avaliar o potencial de produção de lipases pelas linhagens fúngicas isoladas, foram medidos os halos de decomposição, de acordo com metodologia proposta por Freire (1996). O crescimento dos halos de decomposição foi acompanhado após incubação das placas por 24 horas a 4°C, por meio de aferições com auxílio de um paquímetro.

Tabela 2. Composição para o meio de detecção enzimática realizado com as linhagens fúngicas obtidas a partir da bioprospecção realizado com o efluente da indústria de sorvetes, Petrolina-PE, Nordeste do Brasil. *, Ausente.

Componentes	Meio com Azeite	Meio com Gordura da Palma
Azeite de oliva	2%	*

Gordura da Palma	*	2%
Ágar	18g/L	18g/L
Tween 80	2%	2%
Água destilada	1000 mL	1000 mL

Fonte: Autora, 2024.

Os isolados fúngicos que apresentaram halo de degradação em torno da colônia tiveram a atividade enzimática avaliada pelo índice enzimático (IE), dado pela relação do diâmetro do halo lipolítico (R) pelo diâmetro da colônia (r). (STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998). Desta forma, quanto maior o halo degradativo maior o índice enzimático. A fórmula utilizada para calcular o IE, para cada isolado foi: $IE = \Phi_h / \Phi_c$

Adotou-se que:

Φ_h - diâmetro do

halo;

Φ_c - diâmetro da

colônia.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Tukey utilizando o programa estatístico Agrostat (AGROSTAT, 2018), considerando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS E OBSERVAÇÃO MORFOLÓGICA

Foram obtidos quatorze (14) isolados fúngicos após bioprospecção nos quatro diferentes meios de cultura (Tabela 3).

Tabela 3. Morfotipos encontrados nos diferentes meios de cultura e locais de coleta utilizados para o isolamento fúngico durante o processo de bioprospecção realizado com o efluente da indústria de sorvetes, Petrolina-PE, Nordeste do Brasil. BDA, Batata, dextrose e ágar.

MORFOTIPO	MEIO DE CULTURA	LOCAL DE COLETA
Morfotipo 13	BDA	Adensamento do Lodo
Morfotipo 3	BDA com Azeite	Adensamento do Lodo
Morfotipo 4	Meio comercial a 10%	Adensamento do Lodo
Morfotipo 5	BDA	Adensamento do Lodo

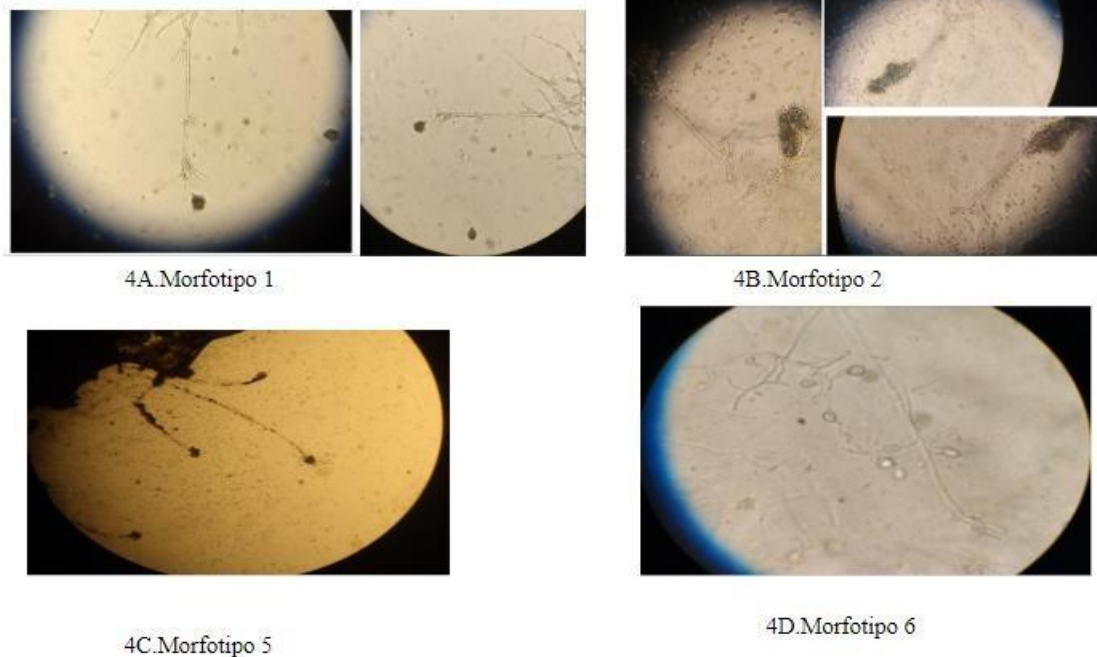
Morfotipo 10	BDA	Adensamento do Lodo
Morfotipo 11	BDA	Entrada do Efluente
Morfotipo 7	BDA	Adensamento do Lodo
Morfotipo 8	Meio comercial a 25%	Adensamento do Lodo
Morfotipo 9	Meio comercial a 10%	Adensamento do Lodo
Morfotipo 2	BDA com Azeite	Adensamento do Lodo
Morfotipo 12	BDA	Entrada
Morfotipo 1	BDA com Azeite	Adensamento do Lodo
Morfotipo 14	Meio comercial a 10%	Adensamento do Lodo
Morfotipo 6	BDA	Adensamento do Lodo

Fonte: Autora, 2024.

De acordo com a observação morfológica, as características individuais apresentadas em cada morfotipo foram: O morfotipo 1 apresenta coloração branca e amarelo claro, micélio com volume bastante expressivo, as colônias se organizam de maneira uniforme, mas esporulada. Suas características morfológicas a olho nu se diferem dos demais isolados, entretanto, suas hifas apresentam grande semelhança, o que indica que pode ser do mesmo gênero, mas de espécies diferentes. (Figura 1A).

Já o morfotipo 2 apresenta coloração bege claro, micélio com esporos de volume mediano, as colônias se organizam de maneira uniforme e rugosa (Figura 1B). A partir de bioprospecção foi possível identificar semelhança morfológica do morfotipo 5 com o gênero *Aspergillus*. Estes fungos apresentam coloração preta com esporos bem visíveis e de grande volume, com colônias organizadas de forma bastante esporulada. (Figura 1C). O morfotipo F1.15 apresenta estrutura diferenciada dos demais, com cor bege e alguns esporos esbranquiçados, micélio com esporos de pouco volume e as colônias com aparência rugosa. (Figura 1D).

Figura 1. Identificação morfológica dos morfotipos encontrados do efluente da ETE da indústria de sorvetes, de acordo com observação microscopia e características da colônia.



Fonte: Autora,2024.

No estudo realizado por Roveda et al. (2010), foi realizada a utilização de efluente de laticínios para isolar microorganismos e empregá-los como substrato na produção de lipases, assim como o presente trabalho. O resultado foi a identificação de 21 tipos de fungos diferentes, sendo que aqueles dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* demonstraram as mais altas atividades enzimáticas. Em um estudo conduzido por Rodrigues et al. (2016), cem isolados de fungos foram avaliados quanto à atividade lipolítica. Esses fungos foram obtidos de escumas de caixa de gordura, esgoto, solo, tecidos necrosados de plantas e insetos. Foi observado que as espécies *Penicillium sp.* e *Rhizomucor sp.* apresentaram notável atividade lipásica na decomposição de escumas de caixa de gordura.

De acordo com Gopinath et al. (2013), a produção de lipase extracelular por fungos *Zigomicetos* tem sido amplamente estudada, o que justifica a sua inclusão neste estudo. Os gêneros mais referidos na produção de lipase são *Rhizopus*, *Mucor* e *Rhizomucor*. (SHARMA et al., 2016; PANDEY et al., 2015; COLLA et al., 2012; SINGH E MUKHOPADHYAY, 2012; VERMA et al., 2012). *Cunninghamella verticillata*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus stolonifer*, *Absidia corymbifera*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus* e *Rhizopus stolonifer* também são mencionados como possíveis fungos *Zigomicetos* para a produção de lipases. (SINGH E MUKHOPADHYAY, 2012; GOPINATH et al., 2013). Por fim, Salgado

et al. (2016) examinou a produção de enzimas durante o processo de biorremediação e constatou uma alta produção de lipase por *Aspergillus ibericus*, *Aspergillus uvarum* e *Aspergillus niger*.

Nesta pesquisa o maior crescimento microbiológico se deu no adensamento do lodo, devido ao lodo conter mais matéria orgânica, com condições mais favoráveis ao crescimento microbiano. (SALES,2023). O tamanho e a composição de flocos biológicos estão diretamente relacionados à qualidade e eficiência do processo de tratamento do efluente realizado pela indústria em evidência.

4.2. DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E ÍNDICE ENZIMÁTICO PARA LIPASE

Parte dos isolados fúngicos obtidos neste trabalho foram submetidos á avaliação da atividade enzimática para a detecção de lipase (Tabela 4). Diante das condições oferecidas aos microrganismos, todos apresentaram potencial enzimático para produção de lipase.

Tabela 4. Médias obtidas através do índice enzimático de cada isolado fúngico encontrado no efluente da estação de tratamento da indústria de sorvetes, Petrolina-PE, em meios de culturas enriquecidos com diferentes fontes de gordura no tempo de 144 horas.

ISOLADOS	MÉDIA AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA - MEIO COM AZEITE DE OLIVA	MÉDIA AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA - MEIO COM GORDURA DE PALMA
Morfotipo 13	0,220	0
Morfotipo 4	0,251	0,240
Morfotipo 5	0,200	0,233
Morfotipo 10	0,233	0,200
Morfotipo 8	0,251	0,216
Morfotipo 9	0,251	0,200
Morfotipo 2	0,253	0,238
Morfotipo 6	0,237	0,212333

Fonte: Autora,2024.

Nota: (+) isolados que apresentaram produção para a enzima lipase para aplicações industriais, que estabeleceu 0,2 como fator mínimo.

Treichel et al. (2010) relatam que microrganismos produtores de lipase foram encontrados em diferentes habitats, tais como resíduos industriais, fábricas de transformação de óleos vegetais, laticínios, solo contaminado com óleo e oleaginosas, entre outros. Locais que apresentam composições de lipídeos no ambiente são lugares favoráveis para o crescimento de microrganismos produtores da enzima em estudo. O motivo é que essas

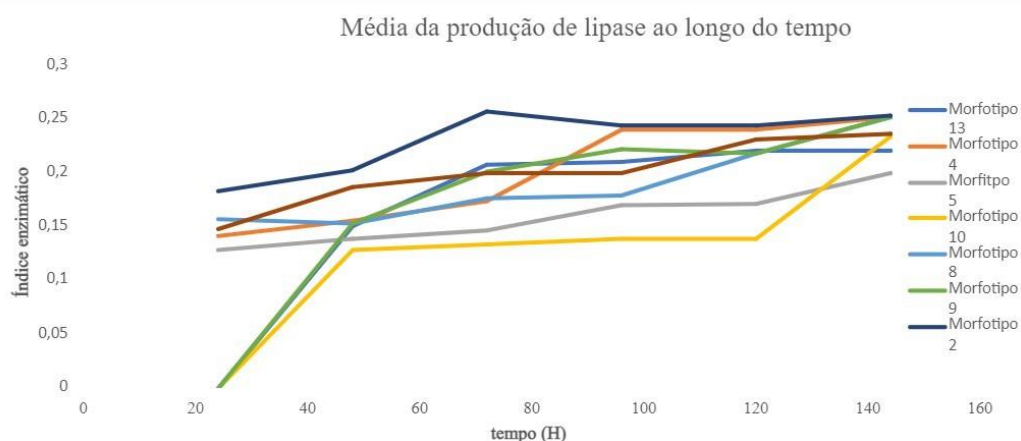
enzimas são degradadoras de gordura.

As lipases fúngicas extracelulares, têm sua produção influenciada pelas condições nutricionais e fatores físico-químicos, tais como pH, temperatura e agitação. (ROVEDA et al., 2010). O fator mais importante para a expressão dessas enzimas é a fonte de carbono, uma vez que a maioria das lipases são indutíveis. (SANTOS,2015). Dessa forma, o óleo de oliva, devido a grande quantidade de ácido oleico, também utilizado neste trabalho, é uma alternativa de baixo custo para ser utilizado como substrato de grande potencial pra exibição da enzima lipase.

As lipases são consideradas enzimas induzíveis (THAKUR, 2012), e óleos e gorduras são bons indutores para aumentar a produtividade das enzimas lipolíticas (RIGO, 2009). Apesar disso, Reinehr (2015) relata que muitas vezes a suplementação não resulta no aumento da produção de lipase, devido ao efeito inibitório causado pelo excesso de substrato. Ao se considerar a seleção de fungos produtores de lipase, como neste trabalho, os resultados referentes à forma de expressão da atividade da lipase (extracelular ou intracelular) devem ser considerados com muito cuidado, pois muitas variações têm sido relatadas conforme Andrade et al. (2012)

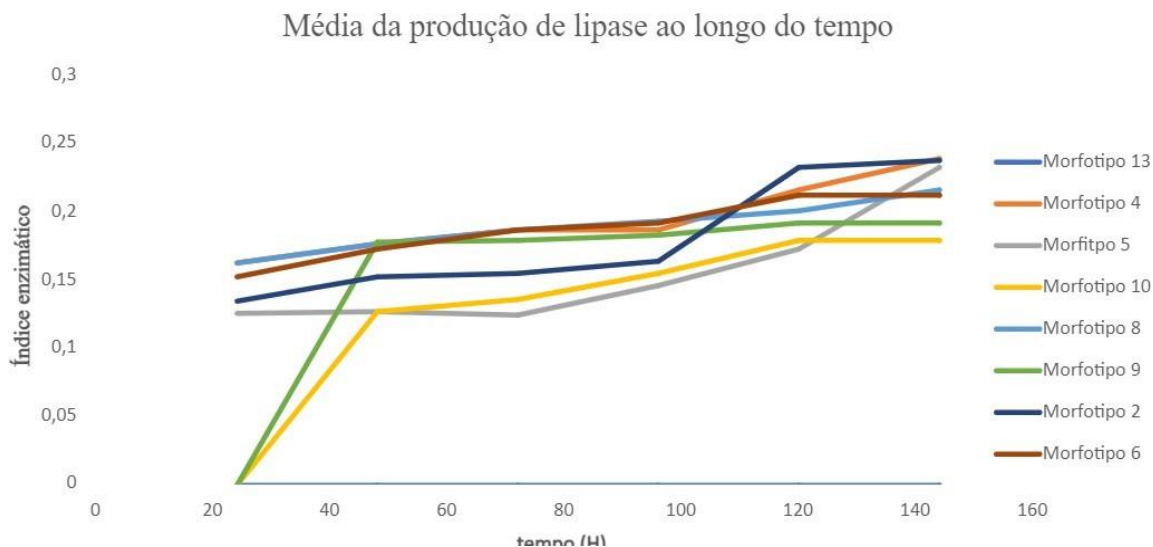
Os valores de índice enzimático da lipase para as linhagens fúngicas isoladas nos diferentes meios estão apresentados na Tabela 4. Os gráficos abaixo apresentam a comparação entre as médias dos índices enzimáticos ao longo tempo (Gráfico 1).

Gráfico 1. Isolados com potencial enzimático para aplicações industriais, representando o Halo Hidrolítico de cada morfotipo no meio BDA enriquecido com azeite de oliva.



Fonte: Autora, 2024.

Gráfico 2. Isolados com potencial enzimático para aplicações industriais, representando o Halo Hidrolítico de cada morfotipo no meio BDA enriquecido com a gordura de palma.



Fonte: Autora, 2024.

O morfotipo 2, possui o maior halo hidrolítico ao longo do tempo, ao fim das 144 horas, apresenta 0,2533mm no azeite e 0,238mm na palma, apresentando um comportamento linear e crescente em ambos os tratamentos, que morfologicamente se assemelha com o gênero *Penicillium*, morfotipo 8 e o morfotipo 9 apresenta comportamentos semelhantes ao longo do tempo, sendo assim apresentaram resultados próximos, sendo eles, 0,251mm no azeite, em ambos, os morfotipos apresentaram o mesmo índice de degradação no tratamento do azeite de oliva, já na gordura de palma os halos foram de 0,216mm e 0,192mm, respectivamente.

O morfotipo 13 degradou apenas o meio enriquecido com azeite, resultando em um halo de 0,220 mm, ao final das 144 horas. O morfotipo 4 apresentou o segundo maior halo hidrolítico resultando em um halo de 0,251mm no azeite de oliva, igualmente ao morfotipo 10, entretanto, o morfotipo 4 também degradou o meio BDA enriquecido com a gordura de palma, resultando em um halo de 0,240mm ao final das 144 horas, já o morfotipo 10 não degradou o meio enriquecido com a gordura de palma.

Avaliar a atividade enzimática pode ser feito observando a velocidade de produção do produto ou a velocidade de consumo do substrato. Essa atividade é influenciada por diversos fatores, como tempo de reação, concentração de nutrientes, enzima, presença e concentração de indutores, substratos, pH, agitação, temperatura e cofatores ou inibidores. A atividade específica, por sua vez, é determinada pela quantidade de enzima em relação ao número de unidades por miligrama de proteína, o que indica a pureza da enzima. Quanto maior a atividade específica da enzima, menor a probabilidade de estar associada a outras enzimas,

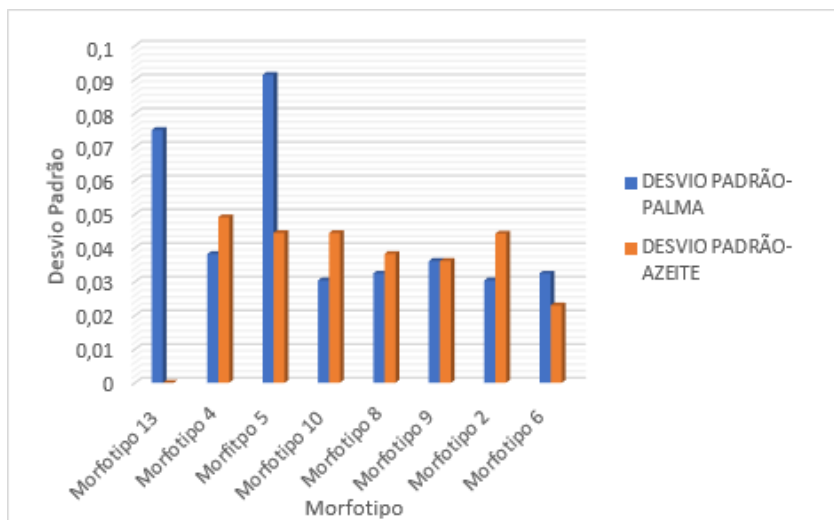
garantindo a pureza do produto final. (COLLA; REINEHR; COSTA, 2012).

As enzimas lipases provenientes de micro-organismos podem ser obtidas através de culturas submersas, às vezes utilizando células imobilizadas, onde diversos estudos estão em andamento para determinar as condições ideais e os nutrientes necessários para a produção da lipase. Uma vez produzida, a atividade da lipase pode ser afetada pelo tipo e quantidade de fontes de carbono, temperatura, pH do meio e concentração de oxigênio dissolvido no caso do processo biológico submerso. De maneira geral, as lipases são estáveis em altas temperaturas, operam em uma ampla faixa de pH, possuem alta especificidade e seletividade, o que torna sua utilização aplicável em diversos processos industriais.

O desvio padrão entre os tratamentos que os morfotipos foram submetidos para a produção do índice enzimático, também foi uma medida relevante, visto que na literatura o azeite de oliva é o mais utilizado como indutor de lipase, apesar de haver teste com meios alternativos. Neste trabalho, a gordura de palma apresenta um comportamento mais linear, tendo um potencial degradativo mais controlado conforme o tempo, apresentando um menor grau de dispersão e estatisticamente foi o tratamento que foi considerado mais adequado.

Os morfotipo 4, 5, 10 e 6, apresentaram um comportamento linear crescente com coeficientes de regressão satisfatórios. O morfotipo 13 apresentou uma equação logarítmica crescente sugerido que também o valor de x e y aumentaram de maneira simultânea com bons coeficientes de regressão. Os morfotipos 9 e 2 se assemelharam por apresentarem um comportamento polinomial. Apesar do meio BDA enriquecido apresentar maior degradação em um intervalo de tempo, o meio enriquecido com a gordura de palma apresenta um comportamento menos disperso, sendo assim apresentando um menor desvio padrão (Gráfico 4), constante e controlado, o que o torna mais interessante quando se considera a perspectiva industrial.

Gráfico 4. Desvio padrão em relação aos meios de culturas enriquecidos com a gordura de palma e azeite, a fim de comparar o conjunto de dados fornecidos através do Halo Hidrolítico de cada morfotipo



Fonte: Autoral, 2024

Neste trabalho utilizou o azeite de oliva e a gordura de palma constituídas por indutores de óleo de atividade lipásica, ou seja, hidrolítica, e como fonte de carbono, para os fungos analisados. O consumo desses recursos carbono hidrolisado, especialmente em termos de seu conteúdo lipídios, serve como uma variável importante (remoção de óleo e gordura) para avaliar o potencial hidrolítico dos isolados.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste trabalho possibilitou a confecção de uma biblioteca de microrganismos com potencial para a produção de lipase. Além disso, com relação aos indutores para produção de lipases, o azeite de oliva e a gordura de palma mostraram-se eficientes. No entanto, o que mostrou maior sucesso em induzir a produção de lipase foi a gordura de palma, sugerindo a possibilidade do emprego de um indutor de baixo custo para obtenção de lipases fúngicas.

As linhagens fúngicas isoladas nesta pesquisa devem ser identificadas e, posteriormente testadas para avaliação da eficiência de produção de lipase e possível aplicação biotecnológica, como no tratamento de efluentes.

6. REFERÊNCIAS

- ALBERTON, Dayane. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, p. 20-28, Curitiba, dez. 2009.
- ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. Ed. New York: John Wiley & Sons, p. 869, 1996.
- ANDRADE, G.S.S.; FREITAS, L; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F (2012). **Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 84, p. 183-188
- AGROSTAT. Indicadores Gerais AGROSTAT. 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: Acesso em: 24 maio. 2024.
- BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. **Solid-state fermentation: an overview**. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 22, n. 1, p. 49-70, 2008.
- BRASIL. **Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica: Módulo III** - Brasília: ANVISA/ Ministério da Saúde, 2004. 45p. Disponível em: www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod_3_2004.pdf
- BRUM, L.F.W.; SANTOS JÚNIOR, L.C.O.; BENEDETTI, S. **Reaproveitamento de Água de Processo e Resíduos da Indústria de Laticínios**. 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production, São Paulo, Brazil, 22 nd, May 20 th 2009.
- BUSS, Dilnei Antunes; HENKES, Jairo Afonso. **Estudo dos impactos ambientais causados por laticínios com foco no reaproveitamento dos resíduos gerados**. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, v. 3, n. 2, p. 384-395, 2014.
- CARVALHO, L.F.F.; P.R.M.B, JUNIOR, M.S.S., CASTIGLIONI, G.L. (2015). **Aplicação de lipase microbiana no tratamento de resíduos oleosos**. *Blucher Chemical Engineering Proceeding*, v.1, n 2, p. 2354-2361
- CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F.; SANDOVAL, G.; MARTY, A. **Lipases: an overview**. In: DIAS, Andrea Alves. **Substitutos de gorduras aplicados em alimentos para fins especiais**. 2007.
- CASTRO H.F; MENDES A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 147-154, 2004.
- CIRNE, D. G.; PALOUMET, X.; BJÖRNSSON, L.; ALVES, M. M.; MATTIASSON, B. **Anaerobic digestion of lipid-rich waste - effects of lipid concentration**. *Renewable Energy*, v. 32, n. 6, p. 965-975, 2007.
- COLLA, L. M.; FICANHA, A. M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C.

O.; COSTA, J. A. V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solidstate and submerged fermentation. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1-10, 2015.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. **Aplicações e produção de lipases microbianas**. *Revista CIATEC – UPF*, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

COSTA, M; OLIVEIRA A. C. Patentes em Biotecnologia: uma Análise da Situação brasileira atual. Disponível em. Acesso em: 01 out 2012.

CLARK, EE. 1965. Agar-plate method for total microbial count. Pp. 1460-1466. In: C.A. Black;

D. Evans; J.L. White; L.E. Ensminger; EE. Clark & R.C. Dinauer (Eds.), *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. Madson Inc., New York.

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

DE SOUZA, F. R. A., DE OLIVEIRA, J. S. T., DA SILVA, D. P., DE OLIVEIRA, M. G., NEVES, D. D., DA SILVA, W. E., & STAMFORD, T. C. M. **Biopolímeros na indústria de alimentos: do aproveitamento de resíduos agroindustriais a produção de biopolímeros**. Verruck S, organizador. *Avanços em ciência e tecnologia de alimentos*, 4, 370-88, 2021.

DE SOUZA, G. B., BARROSO, L. L., DE LIMA FERREIRA, N., DA SILVA, J. E. V. C., DE SOUSA MARTINS, M. M., PACHECO, M. J. B., ... & DE SOUZA MENDONÇA, M. **Análise das etapas de produção e tratamento de efluentes das indústrias de laticínios**. In *Agronegócio e Sustentabilidade: métodos, técnicas, inovação e gestão* (Vol. 1, pp. 106-128). Editora Científica Digital. 2021

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

DIAS, M. F., MARTINS, M. L., DA SILVA, R. R., & TREVIZANO, L. M. **Pré-tratamento enzimático de efluente de indústria de laticínios utilizando lipases microbianas**. *Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente*, 2(1), 51-65. 2021

DIAS, M. F., MARTINS, M. L., DA SILVA, R. R., & TREVIZANO, L. M. (2021). **Pré-tratamento enzimático de efluente de indústria de laticínios utilizando lipases microbianas**. *Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente*, 2(1), 51-65.

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

DUFRECHE, S.; HERNANDEZ, R.; FRENCH, T.; SPARKS, D.; ZAPPI, M.; Alley, E. (2007). **Extraction of lipids from municipal wastewater plant microorganisms for production of biodiesel**. Journal American Oil Chemistry Society, 84, 181

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

ELAIN, A., LE GRAND, A., CORRE, Y. M., LE FELLIC, M., HACHET, N., LE TILLY, V & BRUZAUD, S. **Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production**. *Industrial Crops and Products*, 80, 1-5, 2016.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. **Production of Extracellular Lipase from Aspergillus niger by Solid-State Fermentation**. *Food Technol Biotechnol*. 2006 Mar;44(2):235- 40.

FEDDERN, V. **Produção de lipídios funcionais por ação de lipase fúngica**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2010.

FREIRE, D.M.A; CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) **Enzimas em biotecnologia** – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506 p.

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

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

GOMES, Francisca Souza de Lucena. **Práticas ambientais em uma cooperativa agropecuária no município de Caturité-PB á luz de produção mais limpa**. 2015.

GONÇALVES, Sulliwán da Silva. **Análise econômica da implantação de um sistema de gestão ambiental existente à norma abnt nbr iso 14001**: 2015. 2020.

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

JARDIM, W.F.; CANELA, M.C. Caderno temático volume 1: **fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes remediação de solos**. Campinas, 2004. Disponível em:< <http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno1.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

LINS, Manuela Cristina Mota. **Aproveitamento do glicerol residual no potencial biotecnológico de *Mortierella isabellina* na produção e acumulação de lipídeos.** 2015.

LUCAS, M. R., SOUSA, K. A., JOAQUINA RAMOS, I., & REGO, C. **Desenvolvimento Sustentável, Economia Circular e Educação Empreendedora.** Pesquisa em inovação: múltiplos olhares rumo a uma convergência formativa (recurso eletrônico), 13-30,2019

MARTARELLO, Raquel Dall'agnol. **Purificação de uma beta-galactosidase produzida por *aspergillus foetidus* através de técnicas cromatográficas.** 2016.

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

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

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

OLIVEIRA, Jairo Pinto de et al. **Caracterização físico-química dos resíduos oleosos do saneamento e dos óleos e gorduras extras observados na conversa com os biocombustíveis.** Química Nova, v. 37, pág. 597-602, 2014.

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

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

PASSOS, A. A. C., SÁ, D. M. A. T., MORAIS, G. M. D. D., CHACON, L. S. D. S., & BRAGA, R. C. **Avaliação da incorporação de galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* em sorvetes e comparação com estabilizantes comerciais.** Revista Ciência Agronômica, 47, 275- 282,2016

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

PEREIRA, G. A.; RODRIGUES, E. P.; BARCELLOS, F. G. **Quantificação da atividade lipolítica de *Aureobasidium pullulans* isolados a partir da planta medicinal**

Baccharisdrá cunculifolia DC (Asteraceae). V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina, 2015.

PITTIGLIANI, Aline Horn. **Resíduos de pescado: produção de biodiesel e extração de colágeno produção de biodiesel e extração de colágeno.** 2014.

POLLI, Larissa Ribeiro . **Métodos para a remoção de corantes no tratamento de efluentes da indústria têxtil.** 2023.

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

RÉGIS, Rayssa Falcão Lima. **Produção de enzimas celulolíticas pelo fungo Achaetomium lippiae e sua aplicação na degradação da fibra de coco verde.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. Microbiologia prática: roteiro e manual, bactérias e fungos. 1 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. 112p.

RIBEIRO, Maurício Santana. **Desenvolvimento de um sistema para rastreabilidade de hortaliças: inovação tecnológica aplicada à agricultura.** 2020.

ROVEDA, M. **Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, programa de pós-graduação em engenharia, área de concentração Infra-estrutura e Meio Ambiente, p. 10-28, Passo Fundo, 2007.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. **Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa.** Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 30, n. 1, p. 126-131, Campinas, Jan./Mar. 2010.

SALES, Marcos Adriano Marques Pessôa. **Aplicação de lodo granular aeróbio e consórcio algal-bacteriano no tratamento de esgoto doméstico: formação, mecanismo de remoção de nutrientes e balanço de oxigênio.** 2023.

SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I., Combined bioremediation and enzyme production by *Aspergillus* sp. in olive mill and winery wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, 16-23, 2016.

SANDOVAL, G. (Ed.) **Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols.** Methods in Molecular Biology, v. 861. Springer Science: New York, 2012.

SANSOLDO, Pedro Victor Guerra da Silva. **Biovalorização de resíduos da indústria de sorvetes.** 2019.

SANTOS, G. G. Sorvete: **Processamento, tecnologia e substitutos de sacarose.** Ensaios e

Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, v. 13, n. 2, p. 95-109, 2009.

SANTOS, Sóstenes Fernandes dos. **Caracterização Química da fase gasosa de lodo residual doméstico por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa obtida a partir da pirólise.** 2015.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. **Organic solvent tolerant lipases and applications.** The Scientific World Journal, v. 2014, Article ID 625258, 2014.

SILVA, Danilo José da. **Resíduos na Indústria de Laticínios.** (2011).Disponível em: . Acesso em: 03 abr. 2024

SILVA, I. F. **Produção de amilase por Bacillus Amylolyquefaciens utilizando torta de macaúba (acrocomia Aculeata) e farinha de pupunha (Bactris gasipaes) como substratos.** 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado no Curso de Química) Universidade Federal Dos Vales Do Jequitinhonha E Mucuri, Diamantina, 2012

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

SOUZA, Junélia Alves . **Tratamento de efluentes: um estudo sobre a viabilidade de utilização de coagulantes naturais em laticínios no município de Ituiutaba-MG.** 2022.

SOUZA, Odacy Camilo de. **Produção de lipases por culturas de Trichosporon da Micoteca URM: seleção, produção, purificação e aplicação enzimática.** 2015.

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

THAKUR, S. 2012. **Lipases, its sources, properties and applications: a review.** Int J Sci Eng Res, 3(7), 1-29

THUM, Luíza. **Diagnóstico para a formulação de um sistema de gestão ambiental em uma agroindústria de laticínios no município de Cerro Largo–RS.** 2022.

TREICHEL, H., DE OLIVEIRA, D., MAZUTTI, M. A., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, J. V.2010. A review on microbial lipases production. Food and bioprocess technology, 3(2), 182- 196.

TURKI, S. **Towards the development of systems for high-yield production of microbial lipases.** Biotechnology Letters, v. 35, n. 10, p. 1551-1560.2013

VILELA, Mirian Lima. **Tratamento biológico do resíduo da indústria de sorvetes por Zygomycetes.** 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

WISSMANN, M. A., HEIN, A. F., & NEULS, H. N. H. **Geração de resíduos: uma análise da ecoeficiência nas linhas de produção em uma indústria de laticínios e a influência sobre os custos ambientais.** Anais Do Congresso Brasileiro De Custos - ABC. Recuperado de <https://anaiscbc.emnuvens.com.br/anais/article/view/423>. Acesso em ; 06/02/2024.

ZAVARISE, J. P., & PINOTTI, L. M. (2019). **Progress in the production of fungal lipases by submerged fermentation.** *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*,6(12). <https://dx.doi.org/10.22161/ijaers.612.38>

