

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DÉBORA PRUDENTE LIMA

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS LIPOLÍTICAS A PARTIR DE
SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E SEU EMPREGO NA GERAÇÃO DE
BIOENERGIA**

POÇOS DE CALDAS/MG

2023

DÉBORA PRUDENTE LIMA

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS LIPOLÍTICAS A PARTIR DE
SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E SEU EMPREGO NA GERAÇÃO DE
BIOENERGIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Ariela Veloso de Paula

Co-orientadora: Dra. Grazielle Santos Silva Andrade

Poços de Caldas/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Lima, Débora Prudente .

Produção de células íntegras lipolíticas a partir de subprodutos agroindustriais e seu emprego na geração de bioenergia / Débora Prudente Lima. - Poços de Caldas, MG, 2023.

78 f. -

Orientador(a): Ariela Veloso de Paula.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Lipase. 2. Células íntegras. 3. Fungos filamentosos. 4. Subprodutos agroindustriais. 5. Bioenergia. I. Paula, Ariela Veloso de, orient. II. Título.

DÉBORA PRUDENTE LIMA

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS LIPOLÍTICAS A PARTIR DE SUBPRODUTOS
AGROINDUSTRIAIS E SEU EMPREGO NA GERAÇÃO DE BIOENERGIA**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Engenharia Química.

Aprovada em: 25 de maio de 2023.

Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Heitor Buzetti Simões Bento

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof. Dr. Rafael Brito de Moura

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Ariela Veloso de Paula, Usuário Externo**, em 26/05/2023, às 08:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0991682** e o código CRC **21F64BDF**.

Dedico essa dissertação aos meus pais, minhas irmãs e ao meu querido avô Sebastião Prudente (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos e oportunidades que me proporcionou ao longo da vida, pela sabedoria e força nos momentos difíceis, por sempre me guiar em teus caminhos.

Aos meus pais Márcia e Reginaldo que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e nunca mediram esforços para me auxiliar a alcançar meus sonhos. Obrigada por todo amor e carinho que sempre me deram, pelo apoio nos momentos difíceis, por dividirem comigo minhas conquistas.

Às minhas irmãs Priscila e Alice, por todo apoio, parceria e amor.

À minha orientadora e minha coorientadora por todo apoio e conhecimentos repassados durante esse trabalho.

Aos meus tios Wanderley e Silvia Helena, por todo carinho, amor e apoio.

Ao Cleber e a Glauce pelo suporte durante esses anos de trabalho.

Aos meus amigos pelo companheirismo e por me ajudarem a levar a vida com mais leveza.

Aos meus colegas de mestrado por todos os debates, momentos de descontração e companheirismo no laboratório.

Aos meus professores desde à educação infantil até a pós-graduação por todo conhecimento repassado e por me ajudarem a ser uma pessoa e uma profissional melhor hoje.

Aos servidores e demais funcionários do laboratório e da Unifal-MG como um todo, por todo o apoio durante o desenvolvimento desse trabalho, direta ou indiretamente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - Processo N. : APQ-03176-21.

RESUMO

A crescente produção de resíduos sólidos é uma preocupação mundial e no Brasil o agronegócio é responsável por grande parte dessa produção, que, com descarte inadequado, aumentam os impactos ambientais. Os efluentes lipídicos também são uma preocupação para indústrias de abate, por exemplo, pois a gordura presente neles dificulta seu tratamento. Uma alternativa para tratá-lo é a digestão anaeróbia que gera biogás em seu processo. Contudo a hidrólise se torna sua etapa limitante. Assim, os pré-tratamentos vêm sendo estudados visando reduzir o tempo de hidrólise, como o enzimático, que aplica enzimas hidrolíticas para esse fim, sendo a lipase a mais adequada neste caso. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção de células íntegras com lipase ligada ao micélio a partir dos fungos filamentosos *A. oryzae* e *P. citrinum* e dos subprodutos da indústria de alimentos okará, bagaço de malte e soro de queijo como fontes de nutrientes nos meios de cultura, em busca da melhor alternativa para aplicação na biodigestão anaeróbia de um efluente de abatedouro avícola. Incubou-se os cultivos por 72h à 30°C e 170rpm. Filtrou-se as amostras a vácuo e determinou-se a atividade hidrolítica (AH) do filtrado e biomassa. O fungo *A. oryzae* cultivado em okará apresentou células íntegras com maior AH (51,61±10,43 U/g). A construção da curva de crescimento do fungo apresentou o tempo ideal de cultivo de 96h com AH de 50,22±4,13 U/g e concentração de biomassa de 9,18±0,00 g/L. Os melhores resultados obtidos para os parâmetros bioquímicos da lipase foram no pH 8 e temperatura 45°C (AH = 50,60±0,77 U/g). O teste de armazenamento demonstrou que a biomassa perde 20% da sua AH após 2 meses congelada. A caracterização do efluente apresentou um pH de 6,60, Sólidos Totais, Fixos e Voláteis de 1073,33±29,69 mg/L, 324,00±36,06 mg/L e 749,33±6,43 mg/L, respectivamente, Lipídios 6686,50±16,76 mg/L e DQO 1430,00±99,22 mg/L. Afim de analisar a influência das variáveis temperatura, agitação e pH na Atividade Metanogênica Específica, realizou-se o planejamento fatorial completo 2³ e sua análise estatística demonstrou que apenas a variável temperatura teve influência significativa nos ensaios, com um volume máximo de biogás obtido de 33,33±5,03 mL no ensaio a 30°C sem agitação e pH 6,60. Assim, pode-se concluir que esse estudo apresentou uma alternativa promissora de aplicação de subprodutos na produção de enzimas e geração de bioenergia.

Palavras-chave: lipase; células íntegras; fungos filamentosos; subprodutos agroindustriais; bioenergia.

ABSTRACT

The growing production of solid waste is a worldwide concern and in Brazil agribusiness is responsible for a large part of this production, which, with improper disposal, increases environmental impacts. Lipid effluents are also a concern for slaughter industries, for example, as the fat present in them makes their treatment difficult. An alternative to treat it is anaerobic digestion that generates biogas in its process. However, hydrolysis becomes its limiting step. Thus, pre-treatments have been studied in order to reduce the hydrolysis time, such as the enzymatic one, which applies hydrolytic enzymes for this purpose, with lipase being the most appropriate in this case. Thus, the present work aimed to study the production of whole cells with mycelium-bound lipase from the filamentous fungi *A. oryzae* and *P. citrinum* and by-products of the okara food industry, malt bagasse and cheese whey as sources of nutrients in the culture media, in search of the best alternative for application in the anaerobic digestion of an effluent from a poultry slaughterhouse. The cultures were incubated for 72h at 30°C and 170rpm. The samples were vacuum filtered and the hydrolytic activity (HA) of the filtrate and biomass was determined. The fungus *A. oryzae* cultivated in okará presented intact cells with higher HA (51.61±10.43 U/g). The construction of the fungus growth curve showed the ideal cultivation time of 96h with HA of 50.22±4.13 U/g and biomass concentration of 9.18±0.00 g/L. The best results obtained for lipase biochemical parameters were at pH 8 and temperature 45°C (AH = 50.60±0.77 U/g). The storage test showed that the biomass loses 20% of its HA after 2 months frozen. The characterization of the effluent showed a pH of 6.60, Total, Fixed and Volatile Solids of 1073.33±29.69 mg/L, 324.00±36.06 mg/L and 749.33±6.43 mg/L L, respectively, Lipids 6686.50±16.76 mg/L and COD 1430.00±99.22 mg/L. In order to analyze the influence of temperature, agitation and pH variables on Specific Methanogenic Activity, a full 23 factorial design was carried out and its statistical analysis showed that only the temperature variable had a significant influence on the tests, with a maximum volume of biogas obtained from 33.33±5.03 mL in the assay at 30°C without agitation and pH 6.60. Thus, it can be concluded that this study presented a promising alternative for the application of by-products in the production of enzymes and generation of bioenergy.

Keywords: lipase; whole cells; filamentous fungi; agro-industrial by-products; bioenergy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA DE SOJA - OKARÁ	18
FIGURA 2 - SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA - BAGAÇO DE MALTE.....	19
FIGURA 3 - SUBPRODUTO DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS - SORO DE QUEIJO	20
FIGURA 4 - REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASE	22
FIGURA 5 - FUNGOS UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	28
FIGURA 6 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO SOXHLET	37
FIGURA 7 - SISTEMA PARA ENSAIO DE ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA.....	39
FIGURA 8 - VALORES DE BIOMASSA SECA PRODUZIDA E ATIVIDADE RELATIVA DA BIOMASSA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO	46
FIGURA 9 - BIOMASSA COM LIPASE LIGADA OBTIDA PELO <i>A. ORYZAE</i> CULTIVADO NO MEIO CONTENDO OKARÁ.....	47
FIGURA 10 - GRÁFICO DE BARRAS DE pH EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE RELATIVA DA LIPASE LIGADA AO MICÉLIO PRODUZIDA	48
FIGURA 11 – GRÁFICO DE BARRAS DE TEMPERATURA EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE RELATIVA DA LIPASE LIGADA AO MICÉLIO PRODUZIDA	49
FIGURA 12 - CURVAS DE ESTABILIDADE TÉRMICA DA LIPASE PARA DIFERENTES TEMPERATURAS EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	50
FIGURA 13 - COMPARATIVO DA ATIVIDADE DA LIPASE LIGADA AO MICÉLIO APÓS ARMAZENAMENTO SOB CONGELAMENTO E REFRIGERAÇÃO.....	51
FIGURA 14 - GRÁFICOS COMPARATIVOS DE TEMPO POR VOLUME DE METANO OBSERVADO ENTRE O MODELO DE GOMPERTZ E OS DADOS EXPERIMENTAIS PARA OS TESTES DE AME DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: A1, A2, A3 E A4.....	54
FIGURA 15 - GRÁFICOS COMPARATIVOS DE TEMPO POR VOLUME DE METANO OBSERVADO ENTRE O MODELO DE GOMPERTZ E OS DADOS EXPERIMENTAIS PARA OS TESTES DE AME DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL: A5, A6, A7 E A8.....	55
FIGURA 16 - GRÁFICO DE PARETO COM VARIÁVEIS DE REGRESSÃO EM ORDEM CRESCENTE DE IMPORTÂNCIA DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³	61
FIGURA 17 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E MAPA DE CONTOURNO (B) PARA A GERAÇÃO DE VOLUME DE BIOGÁS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA AGITAÇÃO.....	64
FIGURA 18 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E MAPA DE CONTOURNO (B) PARA A GERAÇÃO DE VOLUME DE BIOGÁS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH INICIAL	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - REAGENTES UTILIZADOS DURANTE O ESTUDO.....	29
TABELA 2 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS DURANTE A EXECUÇÃO DO PRESENTE TRABALHO.	30
TABELA 3 - FORMULAÇÃO DE 1 LITRO DO MEIO DE CULTURA PARA CADA SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL UTILIZADO COMO FONTE DE NUTRIENTES.	31
TABELA 4 - VOLUME/MASSA DAS AMOSTRAS UTILIZADO NA ANÁLISE DE SÓLIDOS.	35
TABELA 5 – MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³	40
TABELA 6 - VALORES MÉDIOS DE CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA SECA PRODUZIDA POR LITRO DE MEIO DE CULTURA, pH INICIAL E FINAL DO CULTIVO, ATIVIDADE DO MICÉLIO E ATIVIDADE DO FILTRADO APÓS 72H DE CULTIVO SUBMERSO PARA CADA MEIO DE CULTURA.....	42
TABELA 7 - DADOS OBTIDOS DA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE DE ABATEDOURO AVÍCOLA.....	52
TABELA 8 - PARÂMETROS MODIFICADOS DO MODELO DE GOMPERTZ PARA OS ENSAIOS DE AME DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E R ²	56
TABELA 9 - DADOS OBTIDOS DE pH INICIAL, pH FINAL, DQO INICIAL E DQO FINAL PARA CADA AMOSTRA DE VARIAÇÃO DE PARÂMETROS NA AME E PARA O TESTE INICIAL.....	59
TABELA 10 - MATRIZ DE PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ COM OS FATORES E OS RESULTADOS OBTIDOS PARA A VARIÁVEL RESPOSTA VOLUME DE BIOGÁS (ML)...	62
TABELA 11 - RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) APLICADA AO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ PARA A VARIÁVEL RESPOSTA.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

A. oryzae – *Aspergillus oryzae*;
P. citrinum – *Penicillium citrinum*;
DQO – Demanda Química de Oxigênio;
COD – *Chemical Oxygen Demand*;
BDA – Batata Dextrose Ágar;
PE – Pernambuco;
MG – Minas Gerais;
AH – Atividade(s) hidrolítica(s);
HA – *Hydrolytic Activity*;
AME – Atividade Metanogênica Específica;
FS – Fermentação Submersa;
FES – Fermentação em Estado Sólido;
ST – Sólidos totais;
SF – Sólidos fixos;
SV – Sólidos voláteis;
m – Massa;
v – Volume;
kg – Quilograma(s);
L – Litro(s);
min – Minuto(s);
mL – Mililitro(s);
°C – Grau(s) Celsius;
rpm – Rotações por minuto;
h – Hora(s);
g – Grama(s);
M – Molar ou mol/L;
mg – miligrama(s);

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	16
3.1.1	Okará.....	17
3.1.2	Bagaço de Malte.....	18
3.1.3	Soro de Queijo.....	19
3.2	ENZIMAS	20
3.3	LIPASE	21
3.3.1	Lipases Microbianas originadas de Fungos Filamentosos.....	22
3.4	DIGESTÃO ANAERÓBIA.....	24
3.4.1	Influência do pré-tratamento enzimático na digestão anaeróbia	26
3.5	EFLUENTE DE ABATEDOURO AVÍCOLA.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	MATERIAIS	28
4.1.1	Microrganismos	28
4.1.2	Meio de Cultura	28
4.1.3	Efluente de abatedouro avícola	29
4.1.4	Lodo anaeróbio	29
4.1.5	Reagentes.....	29
4.2	EQUIPAMENTOS	30
4.3	MÉTODOS.....	30
4.3.1	Preparo do meio de cultura e dos biocatalisadores.....	30
4.3.2	Atividade hidrolítica	32
4.3.3	Teor de umidade	33
4.3.4	Obtenção da curva de crescimento microbiano	33
4.3.5	Caracterização quanto aos parâmetros bioquímicos da enzima	33
4.3.5.1	Determinação do pH e temperatura ótimos de atuação da enzima produzida.....	34
4.3.5.2	Estabilidade térmica.....	34
4.3.5.3	Teste de armazenamento da biomassa	34
4.3.6	Caracterização físico-química dos resíduos	34
4.3.6.1	Teor de sólidos.....	34
4.3.6.2	Teor de lipídios	36
4.3.6.3	Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	37
4.3.7	Ensaio de Metanogênese	38
4.3.7.1	Equação modificada de Gompertz.....	39
4.3.7.2	Análise estatística das variáveis na atividade metanogênica específica	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	SELEÇÃO DA ESPÉCIE DE FUNGO E MEIO DE CULTURA COM MAIOR POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE LIPASE LIGADA AO MICÉLIO	41
5.2	CURVA DE CRESCIMENTO DO <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i>	45
5.3	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DAS LIPASE PRODUZIDA	47
5.3.1	Determinação do pH ótimo de atuação da lipase.....	47
5.3.2	Determinação da temperatura ótima da lipase.....	49
5.3.3	Determinação da estabilidade térmica da lipase.....	50

5.4	TESTE DE ESTOCAGEM E ARMAZENAMENTO	51
5.5	CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE.....	52
5.6	TESTE DE ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA	52
5.6.1	Ensaio de AME conforme o planejamento fatorial completo 2³	53
5.6.1	Análise de pH e DQO após AME.....	58
5.6.2	Análise estatística	60
6	CONCLUSÕES.....	66
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	68
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial gera a cada dia um aumento no consumo em diversos setores, que acarreta numa maior produção de resíduos. Destes pode-se destacar os resíduos sólidos (ABRELPE, 2021), sendo que, por muito tempo não houve uma preocupação com as consequências promovidas por essa produção e consumo descontrolados. No Brasil, assim como em outros países com a agroindústria dominante, os resíduos provenientes dela são preocupantes há muito tempo, principalmente por não possuírem um descarte ou aplicação adequado na maioria das vezes, intensificando os impactos ambientais (ALENCAR *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2020).

Além dos resíduos sólidos, existe uma preocupação com os efluentes gerados por destilarias, abatedouros e indústria de laticínios, que devido à alta presença de uma variedade de matéria orgânica, tem-se uma elevada e indispensável necessidade de tratamento adequado (LIEW *et al.*, 2020). Contudo, alguns fatores podem dificultar esse tratamento. As gorduras, por exemplo, tendem a ocasionar diversos problemas ao longo do tratamento de efluentes, devido a sua degradação lenta. Assim, a digestão anaeróbia de lodos de esgoto se torna uma alternativa viável para tratar esses efluentes, possibilitando, ainda, a geração de biogás, um derivado do processo com valor agregado (LIEW *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2018).

O biogás pode apresentar um maior valor agregado quando analisado a sua composição, por exemplo, uma maior concentração de metano acarreta maior valorização do biogás. Para que essa alta na concentração de metano ocorra de forma mais eficaz, o processo que resulta na produção de biogás precisa ser otimizado. No caso da digestão anaeróbia, essa otimização pode ser feita através de um pré-tratamento enzimático/biológico, que ocasionará a elevação na concentração de metano do biogás produzido (FERREIRA *et al.*, 2020; TROIANO *et al.*, 2020). Para isso ser aplicado de maneira funcional em tratamento de efluentes lipídicos, é necessário otimizar as etapas gargalo do processo, sendo a hidrólise a etapa limitante da digestão anaeróbia desses efluentes (BRAZ *et al.*, 2020; LIEW *et al.*, 2020).

Uma alternativa possível seria a aplicação de uma enzima que irá catalisar a etapa de hidrólise de triacilglicerol em glicerol e ácidos graxos (componentes mais comuns da gordura), melhorando o desempenho microbiano nas fases seguintes da digestão anaeróbia (FERREIRA *et al.*, 2020). Nesse caso, a lipase é a enzima qualificada para aplicação como forma de pré-tratamento desses efluentes lipídicos (LIEW *et al.*, 2020).

Lipases são enzimas capazes de catalisar diferentes reações e podem ser obtidas através de animais, plantas e/ou microrganismos, como fungos e bactérias. Apesar das suas diferentes

fontes de obtenção, as lipases microbianas se destacam como as que possuem uma maior importância industrial, sendo muito utilizadas como biocatalisadores em diversas aplicações biotecnológicas (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; JAVED *et al.*, 2018; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019).

Os fungos filamentosos se destacam com resultados promissores na produção de lipase, onde tem-se os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Candida*, *Geotrichum* e *Thermomyces* em destaque na literatura (FERREIRA *et al.*, 2020; ZAVARISE; PINOTTI, 2020).

Dentre as formas apresentadas na literatura, as lipases ligadas ao micélio vêm sendo fortemente estudadas, a fim de explorar seus potenciais usos biotecnológicos (SOLARTE *et al.*, 2014). Quando comparadas com as lipases extracelulares convencionais, as ligadas ao micélio se apresentam mais interessantes por possuírem uma maior estabilidade operacional, uma vez que sua estrutura celular atua como uma matriz natural, protegendo as enzimas de possíveis ações externas que afetem negativamente seu desempenho, proporcionando um efeito semelhante ao ocasionado pela imobilização de enzimas (ANDRADE *et al.*, 2014; ZHOU; CHEN; YAN, 2015). Esses biocatalisadores podem ser preparados através de um cultivo com meio nutritivo, podendo ser de baixo custo, e são facilmente recuperados através da filtração (ALVES *et al.*, 2019). Isso possibilita a utilização dos resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes para complementar o meio de cultura, como proposto nesse estudo, como uma alternativa de valorização destes, contribuindo para a redução dos impactos ambientais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo produzir células íntegras com lipase ligada ao micélio a partir dos fungos filamentosos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus oryzae* e aplicar as células íntegras produzidas na digestão anaeróbia de um efluente de abatedouro avícola visando à produção do biogás.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Visando-se atingir o objetivo geral do projeto, as seguintes atividades foram efetuadas:

- a) Prepararam-se as células íntegras dos fungos filamentosos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus oryzae* utilizando os nutrientes extraídos de subprodutos da indústria de alimentos;
- b) Caracterizou-se a lipase produzida quanto ao seu pH e temperatura ótimos e estabilidade térmica;
- c) Avaliou-se a estabilidade de armazenamento da biomassa produzida;
- d) Avaliou-se a aplicação do tratamento híbrido, contendo as células íntegras e lodo anaeróbio, na degradação do efluente proveniente de abatedouro avícola;
- e) Caracterizou-se o efluente utilizado quanto aos seus parâmetros físico-químicos: DQO, teor de lipídios e pH;
- f) Analisaram-se os parâmetros de DQO e pH antes e após a digestão anaeróbia.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Sabe-se que nos últimos anos a quantidade de resíduos sólidos produzidos, tanto no ambiente industrial como no urbano, que cresceu significativamente. Segundo dados da Abrelpe (2021), em 2020 geraram-se cerca de 82,5 milhões de toneladas de resíduos sólido no Brasil, só no ambiente urbano, sendo cada brasileiro responsável por gerar cerca de 1,07kg de resíduo diariamente. Esses dados disponibilizados pela Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (ABRELPE, 2021), que fazem parte do Panorama dos Resíduos Sólidos, quando comparados aos dados dos demais países da América Latina, apresentam o Brasil como campeão de geração de lixo, 40% do total gerado na região, o equivalente a cerca de 541 mil toneladas de resíduos sólidos por dia (SOUZA, 2019).

No Brasil, pode-se destacar o agronegócio como um influenciador na elevada produção de resíduos e em âmbito global, a produção de resíduos agroindustriais pode atingir cerca de 1,3 bilhões de toneladas anualmente (ALENCAR *et al.*, 2020). Além disso, grande parte desses resíduos produzidos são descartados incorretamente, ocasionando diversos problemas ambientais. Sendo assim, o reaproveitamento desses resíduos se torna uma alternativa atrativa para reduzir os danos ambientais ocasionados, visto que muitos desses podem gerar produtos com valor agregado, como por exemplo: etanol e outros biocombustíveis, ácidos orgânicos, enzimas e outros (MARZO *et al.*, 2019).

Dentre os tipos de resíduos agroindustriais gerados, tem-se aqueles provenientes do processamento de fibras, madeira e alimentos, os resíduos sólidos como as sobras, resíduos de escritório, lodo e as águas residuárias formadas a partir da lavagem de equipamentos, produtos, instalações e cozimento (COSTA FILHO *et al.*, 2017). Alencar *et al.* (2020) destacam que os resíduos podem ser denominados orgânicos, provenientes da agricultura e pecuária, e inorgânicos, provenientes de embalagens de insumos agrícolas e veterinários e resíduos domésticos rurais. Sendo assim, pode-se afirmar que existe uma vasta quantidade de resíduos agroindustriais. Em alguns casos, estes podem ser denominados subprodutos, por possuírem diferentes aplicações devido, por exemplo, a sua riqueza em nutrientes, como fibras, proteínas, carboidratos, entre outros. Nesse caso, os subprodutos se tornam uma boa alternativa como fonte de nutrientes para microrganismos (MELO, 2021; PANESAR *et al.*, 2016).

Assim, o desenvolvimento de projetos que visam a reutilização desses subprodutos para minimizar seus impactos e gerar produtos e soluções de valor agregado é muito importante. Neste contexto, o presente trabalho visou aplicar três subprodutos da indústria de alimentos na

produção de células íntegras com lipase ligada ao micélio, em busca de lhes proporcionar uma alternativa de destino aplicável. Para isso, foram utilizados subprodutos de fácil obtenção na região de Poços de Caldas-MG: o okará, bagaço de malte e soro de queijo.

3.1.1 Okará

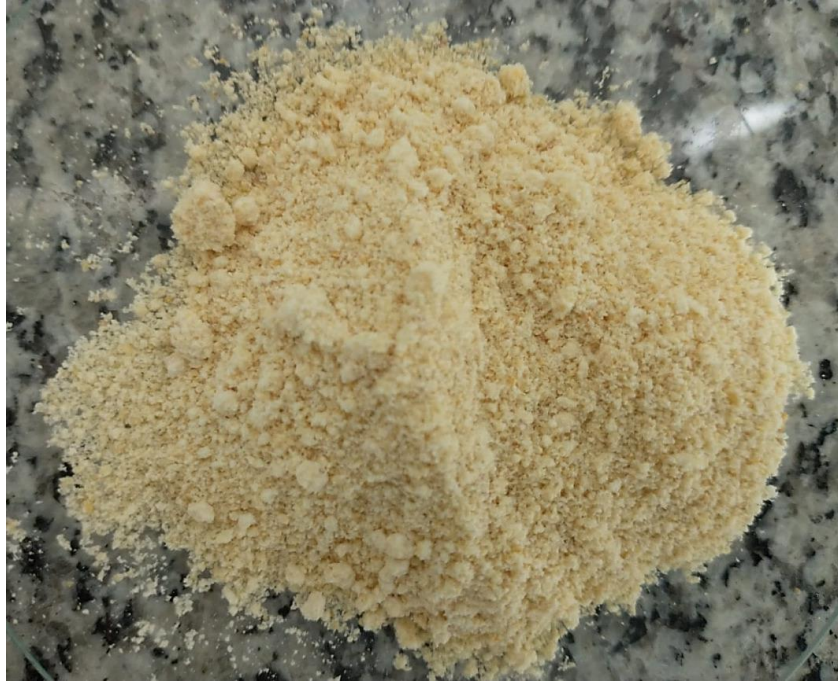
O cultivo da soja no Brasil se deu no início do século XX e com um crescimento no interesse pelo produto e seus derivados, como o óleo, sua produção foi ampliada em meados dos anos 70, sendo o Brasil considerado um dos maiores produtores de soja do mundo, juntamente com os Estados Unidos, China e Argentina na época. Nos últimos anos, a produção de soja cresceu muito no Brasil. Segundo dados da Embrapa Soja (2021) a safra de 2020/21 teve uma produção mundial de 362,947 milhões de toneladas, sendo o Brasil o maior produtor de soja do mundo com uma produção de 135,409 milhões de toneladas, seguido dos Estados Unidos com 112,549 milhões de toneladas produzidas. Os estados com mais produtividade de soja são Mato Grosso (35,947 milhões de toneladas), Rio Grande do Sul (20,164 milhões de toneladas), Paraná (19,872 milhões de toneladas) e Goiás (13,720 milhões de toneladas), respectivamente (EMBRAPA SOJA, 2021).

A partir do processamento da soja, tem-se diversos produtos, subprodutos e resíduos. Dentre os alimentos derivados da soja, pode-se destacar o seu extrato hidrossolúvel, popularmente conhecido como “leite de soja”. Este é um produto obtido da trituração, maceração e prensagem dos grãos de soja. Assim, a partir desse processo, é possível obter um subproduto de polpa amarelada, denominado okará (PAULA *et al.*, 2019; PEREIRA, 2017).

O okará é composto por diversos nutrientes, como: lipídeos, proteínas, carboidratos e fibras. Durante o processo de obtenção do “leite de soja”, para cada 1 kg de grãos de soja utilizados, tem-se a produção de 1,1 kg de okará fresco (com alto teor de umidade) (PEREIRA, 2017). Estudos demonstram que apesar de seu alto valor nutricional, o okará não possui um valor de mercado atraente, pois devido a sua elevada umidade se torna um produto altamente perecível (MULITERNO *et al.*, 2017).

Na figura 1, tem-se o okará utilizado no desenvolvimento desse trabalho

Figura 1 – Subproduto da indústria de soja - okará



Fonte: própria autora.

3.1.2 Bagaço de Malte

No mundo todo, a cerveja é uma das bebidas mais produzidas e consumidas, sendo seu principal ingrediente, o malte de cevada. O Brasil é considerado um dos maiores produtores de cerveja do mundo, ocupando o terceiro lugar com uma produção de aproximadamente 14 bilhões de litros de cerveja por ano (CHIMINI *et al.*, 2020). Conforme mostrado por Marcusso e Müller (2019), a produção da bebida cresceu exponencialmente no país após a grande implementação de pequenas cervejarias. Esse fato é comprovado quando o número de cervejarias registradas cresce de 200 para quase 900 entre os anos de 2013 e 2018. No ano de 2020 esse número cresceu para 1383 (MAPA, 2021)

Contudo, essa produção gera um alto volume de resíduos sólidos e líquidos, chegando a reduzir cerca de 20L do volume final de água cervejeira de uma produção de 100L, visto que possuem um teor de umidade entre 80 e 90%, impactando a produção, seu rendimento e a geração de efluentes. Esses resíduos são conhecidos como *trub*, bagaço de malte e levedura residual (RECH, ZORZAN, 2017). Dos três, o bagaço de malte é o mais abundante e apesar de apresentar alto valor nutricional, possui um valor de mercado muito baixo, as vezes inexistente, e um volume anual de produção relativamente alto. Este se origina após a mosturação, onde já foi constituído o mosto doce e corresponde a aproximadamente 85% dos resíduos sólidos gerados em todo o processo produtivo (ALIYU; BALA, 2011; CHIMINI *et al.*, 2020).

Segundo Rech e Zorzán (2017) tem-se cerca de 130 kg de bagaço para cada 100 kg de grãos utilizados no processo e apesar do seu principal destino - alimentação animal (aves, suínos, bovinos, etc) -, o bagaço de malte representa um problema para os pecuaristas, uma vez que seu armazenamento adequado é dificultado devido ao alto teor de umidade, gerando contaminações e uma perda considerável do produto, tornando essa aplicação inviável. (ALIYU; BALA, 2011; PARPINELLI, 2016). Na figura 2 está apresentado o bagaço de malte utilizado no desenvolvimento desse trabalho.

Figura 2 - Subproduto da indústria cervejeira - bagaço de malte



Fonte: própria autora.

3.1.3 Soro de Queijo

O Brasil apresenta uma grande produção de derivados de leite, principalmente o queijo. Segundo dados da Embrapa Gado de Leite (2018), em 2017 foram produzidos cerca de 1 milhão de toneladas de queijos no Brasil

Dentro da produção de queijos, tem-se a formação de um subproduto denominado soro de queijo. Este representa cerca de 85 a 95% do volume total de leite utilizado na produção e pode apresentar em torno de 55% dos nutrientes que compõe o leite. Além disso, suas características podem variar de acordo com as mudanças na alimentação do animal, a origem do leite – cabra, vaca, búfala, etc. – o estágio da lactação, a época do ano, o processamento do produto e as enzimas utilizadas (BRAZ, 2019; GANJU; GOGATE, 2017).

O soro é comumente composto por lipídios, sais minerais, proteínas, lactose e água,

além de apresentar uma alta Demanda Química de Oxigênio (DQO), podendo ser superior ao efluente doméstico cerca de 175 vezes, tornando seu tratamento extremamente necessário e ocasionando restrições quando ao descarte inadequado (BRAZ, 2019; ESCALANTE *et al.*, 2018). Já existem diversas alternativas para gerenciar esse resíduo, como, por exemplo, os tratamentos biológicos que promovem a obtenção de produtos de maior valor agregado como o etanol, biogás, ácidos orgânicos, processo que visam a redução da carga orgânica, como a floculação, ozonização, entre outros (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012).

O soro de queijo está diretamente ligado à produção de enzimas, sendo a mais comum a lactase. Além dela, tem-se a possível obtenção de lipase, amilases e proteases (TAVARES; MALCATA, 2015). Na Figura 3 abaixo, tem-se apresentado o soro de queijo utilizado nesse trabalho para a produção da enzima lipase ligada ao micélio.

Figura 3 - Subproduto da indústria de laticínios - soro de queijo



Fonte: própria autora.

3.2 ENZIMAS

As enzimas são proteínas conhecidas por sua alta especificidade como catalizadoras. Para que uma enzima exerça sua função, existem alguns parâmetros adequados, variando para cada tipo e aplicação, sendo os principais pH e temperatura. Além disso, por não apresentarem toxicidade e possuírem biodegradabilidade, são excelentes opções para substituir catalisadores químicos. Contudo, sabe-se que o processo de produção e purificação de enzimas apresenta um alto custo (SINGH *et al.*, 2016).

Alguns fatores podem afetar a atuação da enzima de forma eficaz, reduzindo sua atividade enzimática, afetando diretamente sua estrutura molecular. Quando submetida às condições externas que diferem das suas ideias, as enzimas sofrem mudança na sua estrutura

molecular, podendo perder totalmente sua atividade enzimática, ou seja, desnaturar (BRAZ, 2019).

No âmbito industrial, as enzimas são altamente empregadas em diversos setores produtivos, como no tratamento de efluentes, produção de papel e celulose, produção têxtil, biocombustíveis, entre outros (ZAVARISE; PINOTTI, 2020).

Segundo dados de 2022 da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB, 2022), as enzimas se apresentam em sete diferentes classes, sendo elas:

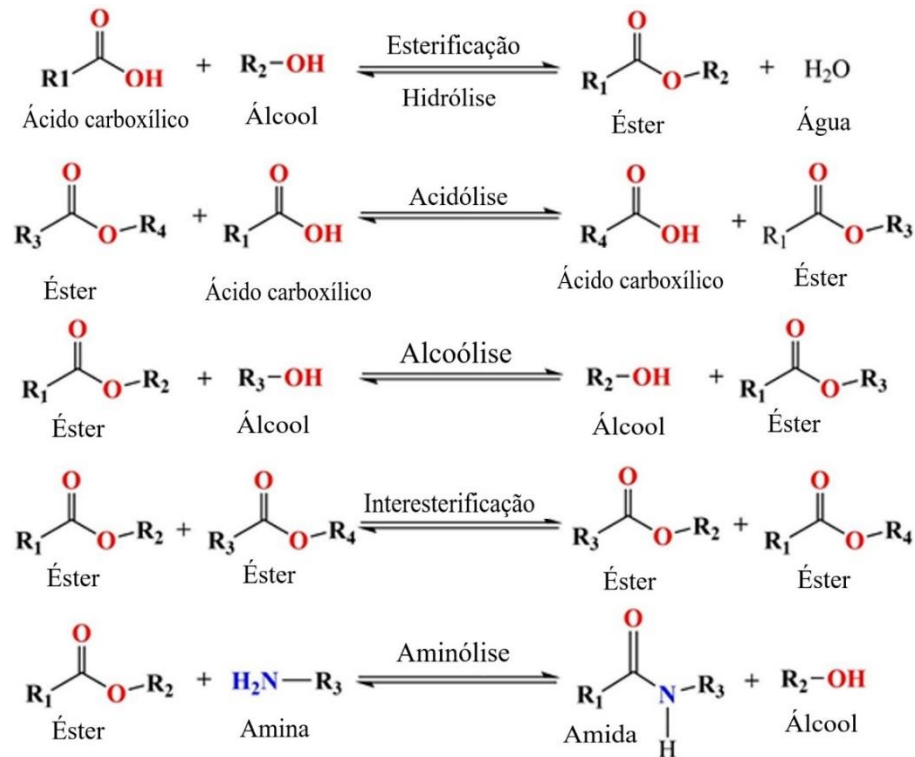
- Oxidorredutases: enzimas que catalisam reações de oxidação-redução. Exemplo: citocromo oxidase, lactato desidrogenase;
- Transferases: enzimas que transferem um grupo (por exemplo: metil, glicosil) de um composto para outro. Exemplo: acetato-cisane, alanina deaminase;
- Hidrolases: enzimas que catalisam a hidrólise de diferentes reações. Exemplo: lipase, sacarase;
- Liases: enzimas que clivam ligações C-C, C-N, C-O e outras por meio diferentes da hidrólise e oxidação. Exemplo: oxalato descarboxilase, isocitrato liase;
- Isomerasas: enzimas que catalisam mudanças dentro de uma única molécula. Exemplo: glicose fosfato isomerase, alanina racemase;
- Ligases: enzimas que catalisam a união de duas moléculas ou de partes de uma molécula com concomitante hidrólise da ligação difosfato no ATP ou um trifosfato similar. Exemplo: acetil-CoA sintase, SNA-ligase;
- Translocases: enzimas que catalisam o movimento de íons ou moléculas através de membranas ou a sua separação dentro das membranas. Exemplo: menaquinol oxidase, carboxibiotina descarboxilase.

Dentre as classes mencionadas, a que se destaca como aquela com maior relevância tecnológica é a das Hidrolases. Isso pode ser justificado pelo fato de que as enzimas pertencentes a essa classe apresentam maior robustez, não necessitam de coenzimas, em maioria, são extracelulares, viabilizando sua utilização em processos que necessitam de enzimas purificadas, e com mecanismo cinético consideravelmente simples. Essa classe representa cerca de 75% do mercado de enzimas industriais e dentro dela, pode-se destacar as enzimas as proteases, lipases e carboidrases como aquelas responsáveis por cerca de 70% do faturamento nesse setor (BRAZ, 2019). Nesse trabalho, será estudada a enzima lipase.

3.3 LIPASE

As lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas que se apresentam em diversidade na natureza, sendo obtidas a partir de animais, vegetais e microrganismos, como os fungos e bactérias (IGARASHI, 2018; MAROTTI, 2016). Estas enzimas são responsáveis por catalisar diferentes reações, como apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Reações catalisadas por lipase



Fonte: Adaptado de Remonatto *et al.* (2022).

A utilização da lipase como catalizador de reação possui diversas aplicações. Dentre elas, pode-se destacar a formulação de produtos detergentes, síntese de biodiesel, produção de biosensores, extração de gordura do couro, tratamento de resíduos e efluentes, entre outros (SARMAH *et al.*, 2018). As lipases podem ser obtidas na natureza através de uma fonte vegetal (frutas, grãos, sementes) animal (em alguns tecidos) e microbiana (bactérias, fungos), contudo a fonte mais utilizada é a microbiana, devido às suas enzimas demonstrarem uma alta especificidade ao substrato e uma variedade nas propriedades catalíticas (IGARASHI, 2018; MELANI, TAMBOURGI; SILVEIRA, 2019).

3.3.1 Lipases Microbianas originadas de Fungos Filamentosos

Dentre as distintas fontes de lipase, aquelas que compõem um grupo importante para a aplicação biotecnológica são as originárias de microrganismos e devido a versatilidade das suas

propriedades, ou seja, estas apresentam uma interessante atividade enzimática e uma interação bem específica com o substrato (IGARASHI, 2018). Além disso, estas enzimas são as mais aplicadas industrialmente, pois possuem uma facilitada produção em larga escala. Isso se porque essas enzimas são mais comumente produzidas na forma extracelular, possuem uma temperatura ótima de operação mais amena e uma faixa de pH maior. Uma das fontes mais importantes dessas lipases são os fungos filamentosos (MAROTTI, 2016).

Desde 1950, alguns trabalhos vêm analisando a viabilidade da produção de lipases através de fungos, tendo elas propriedades interessantes, como a estabilidade em solventes orgânicos, térmica e em meios com pH elevado (ANDRADE *et al.*, 2014; BRAZ, 2019; CHINAGLIA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2010; MAROTTI, 2016; ZAVARISE; PINOTTI, 2020). Contudo, ainda é restrito o número de espécies produtoras de lipase com características estáveis para utilização e futura aplicação industrial, por isso é de extrema importância o desenvolvimento de novos trabalhos que explorem a fundo as espécies produtoras da enzima. Trabalhos recentes mostram a produção de lipase a partir de espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (CONG *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; MEHTA; GROVER; GUPTA, 2018), os pertencentes ao gênero *Penicillium* (ALVES *et al.*, 2019; MAROTTI, 2016; VARDANEGA *et al.*, 2010) e ao gênero *Mucor* (ANDRADE *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2012; CARVALHO, 2015).

As lipases microbianas podem ser separadas em duas classes: intracelulares e extracelulares. Os microrganismos produtores de lipases intracelulares possuem elas armazenadas em sua estrutura celular, podendo necessitar, posteriormente de uma ruptura das células e separação, enquanto as extracelulares são secretadas para o meio diretamente (GEOFFRY; ACHUR, 2018; MEHTA; BODH; GUPTA, 2017). Existem, também, as chamadas lipases ligadas ao micélio. Estas podem ser definidas como lipases ligadas à biomassa fúngica produzida e possuem uma aplicação direta como biocatalisador, minimizando, ou até eliminando, etapas de alto custo como a purificação e imobilização (LIMA *et al.*, 2019; MAROTTI, 2017).

O termo “ligada ao micélio” se aplica a todas as enzimas que ficam aderidas às células depois da separação entre as células e o meio de cultura. Estudos acerca das células íntegras, ou com lipase ligada ao micélio, vêm sendo desenvolvidos desde 1979 e isso se dá pela sua aplicação em biocatálise. Trabalhos mais recentes apresentam a lipase ligada ao micélio com alta atividade lipolítica e com aplicações em reações próprias da lipase (ANDRADE *et al.*, 2012, 2014; BRAZ, 2019; IGARASHI, 2018; XIAO *et al.*, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2012).

Igarashi (2018) cita que semelhante à imobilização convencional já conhecida, nessas

células íntegras com lipase naturalmente ligada, existe uma redução na perda de atividade por ação de solventes e uma manutenção da atividade por um período mais longo, uma vez que a estrutura celular atua como uma matriz natural.

Nos últimos anos, trabalhos foram desenvolvidos visando a produção de células íntegras a partir de fungos filamentosos como os do gênero *Aspergillus* (GULDHE *et al.*, 2016; SOLARTE *et al.*, 2014), *Rhizopus* (ARAYA *et al.*, 2015; KYEONG; YEOM, 2014) e *Penicillium* (DHEEMAN *et al.*, 2011; MAROTTI *et al.*, 2017). No geral, esses trabalhos apresentaram células íntegras com alta atividade lipolítica e aplicadas às reações de transesterificação, hidrólise e esterificação.

Para a obtenção da lipase microbiana, é necessária a realização do crescimento desses fungos em um substrato. Esse processo é dado através de um cultivo e pode ocorrer no meio sólido (Fermentação em Estado Sólido) ou meio líquido (Fermentação Submersa) (RIGO *et al.*, 2021).

A fermentação em estado sólido (FES) é aquela que ocorre em um meio sólido úmido ou em substratos insolúveis, ambos sem água líquida disponível, proporcionando um ambiente semelhante ao natural no qual muitos microrganismos já estão adaptados. Já a fermentação submersa (FS) ocorre em meio com excesso de água, onde os microrganismos são suspensos em um meio líquido contendo nutrientes dissolvidos necessário para auxiliar no seu crescimento (FARINAS, 2015; FERRAZ *et al.*, 2018). Quando comparadas, a FS destaca em relação a FES, por proporcionar a facilidade maior do controle das variáveis do cultivo, além de facilitar a transferência de calor e de massa por possuir agitação constante. Contudo o uso de resíduos sólidos é mais utilizado atualmente na FES (ZAVARISE; PINOTTI, 2020). Nesse trabalho foi explorada a produção de lipase ligada ao micélio por fermentação submersa utilizando os fungos filamentosos *Aspergillus oryzae* e *Penicillium citrinum*. Posteriormente a biomassa com células íntegras de maior atividade hidrolítica foram aplicadas simultaneamente à digestão anaeróbia de um efluente de abatedouro avícola.

3.4 DIGESTÃO ANAERÓBIA

A digestão anaeróbia vem sendo descrita na literatura como um processo bioquímico que visa a estabilização de resíduos e acarreta a geração de bioenergia (FARGHALI *et al.*, 2020; SIDDIQUE; WAHID, 2018). Ela se destaca como uma possibilidade versátil de tratamento de efluentes, pois promove a obtenção de bioenergia através da conversão da matéria orgânica em biogás com elevada concentração de metano, além de possibilitar a redução de odores e da emissão de gases do efeito estufa (NESHAT *et al.*, 2017).

Esse processo é dividido em 4 etapas. Inicialmente tem-se a hidrólise, onde ocorre a decomposição de substâncias orgânicas de maior complexibilidade, como os carboidratos, lipídios, proteínas, seguido da acidogênese, onde as bactérias convertem os produtos da hidrólise em moléculas que apresentam menor peso molecular, como os álcoois, ácidos graxos voláteis e os gases dióxido de carbono, amônia e hidrogênio. Após a acidogênese ocorre a etapa denominada acetogênese, onde os gases produzidos anteriormente são consumidos pelas bactérias acetogênicas para formar ácido acético e outros produtos, utilizados na última etapa, a metanogênese, como substrato para as arqueas metanogênicas, proporcionando, nessa etapa, a geração de gás metano e dióxido de carbono (KAINTHOLA *et al.*, 2019; LI; CHEN; WU, 2019; LIEW, *et al.*, 2020; PRAMANIK, *et al.*, 2019;).

Em seu processamento, o biogás é constituído, principalmente, de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), com teor entre 50 e 75% de CH₄ e 25 a 50% de CO₂, contendo, ainda, teores residuais de outros gases e pode ser aplicado para geração de energia, aquecimento e até combustível (AZIZ; HANAFIAH, 2020; KAINTHOLA; KALAMDHAD; GOUD, 2019).

Alguns fatores podem influenciar negativamente o rendimento da digestão anaeróbia, sendo a temperatura e o pH dois parâmetros bem importantes nesse processo, além da taxa de carga orgânica, concentração de ácidos graxos voláteis e a relação Carbono Nitrogênio (KAINTHOLA; KALAMDHAD; GOUD, 2019).

O pH é uma variável de alta influencia no processo de digestão anaeróbia, visto que afeta diretamente na taxa de geração de produtos e crescimento dos microrganismos. Em cada etapa da digestão anaeróbia, os microrganismos apresentam uma faixa melhor de pH de atuação, variando entre 6,5 e 8 e que em condições mais ácidas a atividade metanogênica é reduzida (DUPONT, 2021). Dentre os microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia, as arqueas metanogênicas, que são responsáveis pela produção do metano no biogás, possuem uma sensibilidade a variações grandes de pH, sendo essa faixa, entre 6,5 e 8,0, ideal para não afetar esses microrganismos (KAMYAB; ZILOUEI, 2021).

Outro parâmetro importante nesse processo é a temperatura, pois ela afeta diretamente no metabolismo dos microrganismos envolvidos nesse processo (ARAUJO, 2021). Em temperaturas mais elevadas, pode-se obter uma maior velocidade de crescimento e maior redução de possíveis agentes patogênicos e, para cada faixa de temperatura específica para um melhor desenvolvimento, tem-se uma classificação para os microrganismos, sendo eles: psicrófilos (temperaturas inferiores a 25°), mesófilos (temperaturas entre 25°C e 45°C) e termófilos (temperaturas entre 45°C e 60°C) (MENEZES *et al.*, 2015; SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2022; SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2019). O controle dessa

temperatura é de extrema importância, uma vez que os microrganismos mais sensíveis às variações de temperatura são aqueles presentes nas etapas de acetogênese e metanogênese, com temperatura ideal entre 30 e 35°C (mesófila) e 50 a 55°C (termófila). A queda na temperatura durante o processo pode acarretar a redução do rendimento na produção do biogás (SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2022).

Das quatro etapas envolvem a digestão anaeróbia, a hidrólise se destaca como o gargalo do processo e um dos fatores que ocasiona um maior tempo para que essa etapa ocorra é redução da eficiência ocasionada pela falta de acesso simultâneo dos microrganismos à água e ao substrato, uma vez que estes acabam retidos na interface água/óleo (MARCHETTI, *et al.*, 2020; PASCALE, *et al.*, 2019). Sendo assim, é viável o estudo de uma aplicação nessa etapa, que reduza seu tempo e facilite o restante do processo, como, por exemplo, o pré-tratamento enzimático.

3.4.1 Influência do pré-tratamento enzimático na digestão anaeróbia

O tratamento anaeróbio utilizando reatores se destaca há alguns anos como uma alternativa bastante atrativa quando comparado aos processos aeróbios tradicionalmente aplicados. Isso se dá pela possibilidade da geração de bioenergia, mais especificamente do biogás, uma redução na geração de biomassa, na demanda energética e na área requerida (BRAZ, 2019). Contudo, um fator que influencia negativamente esse tipo de tratamento é o alto teor de gorduras, que pode ocasionar a presença de espuma na superfície dos reatores, provocando o entupimento e a geração de fortes odores (BRAZ, 2019; MENDES; PEREIRA; DE CASTRO, 2006).

Sabe-se que a etapa de hidrólise em um processo de digestão anaeróbia é, normalmente, a etapa limitante. Sendo assim, a aplicação de uma etapa anterior a hidrólise (pré-tratamento), com o uso de métodos químicos, biológicos e/ou físicos visando a redução nessa etapa limitante, acarretaria um menor tempo de hidrólise e, conseqüentemente, uma maior produção de metano, tornando o biogás mais produtivo (ZHANG; HU; LEE, 2016). Para isso, pode-se utilizar de pré-tratamentos físicos, sendo eles térmicos e mecânicos, químicos ou biológicos. Destes mencionados, o pré-tratamento biológico, utilizando a aplicação de enzimas se destaca positivamente, pois as enzimas são catalizadores com alta seletividade e conseguem atuar em temperaturas brandas (entre 30°C e 70°C) e pressão atmosférica, além disso os pré-tratamentos enzimáticos não possuem elevado consumo energético e não geram grandes volumes de subprodutos (CÓRDOVA *et al.*, 2018).

Nesse estudo foi avaliada degradação de um efluente de abatedouro avícola tendo a

aplicação de células íntegras com lipase ligada ao micélio simultânea a digestão anaeróbia, visando reduzir o tempo de hidrólise do processo.

3.5 EFLUENTE DE ABATEDOURO AVÍCOLA

O efluente gerado a partir do processamento de aves apresenta uma alta DQO, turbidez, teor de sólidos, pH um pouco ácido e coloração opaca, devido a presença de vísceras, restos de carne, ossos, gordura animal e penas (FERREIRA *et al.* 2018).

Segundo o relatório de 2022 da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2021 o Brasil apresentou uma produção de carne de frango de 14.329 milhões de toneladas, com 67,83% dessa produção direcionada para o consumo no mercado interno e 32,17% para exportação, sendo o terceiro maior produtor mundial deste ramo, atrás apenas dos Estados Unidos e da China, com 20.378 e 14.700 milhões de toneladas produzidas, respectivamente. Das regiões com maior produção desse tipo de carne, o Sul se destaca como a região com maior porcentagem de abate de frango do país, sendo o Paraná o maior produtor, com 35,54%, seguido por Santa Catarina com 14,89% e Rio Grande do Sul com 13,65% (ABPA, 2022). O crescimento do país como produtor de carne de frango contribui, conseqüentemente, com o aumento na geração de efluentes. Em um processo de produção de carne de frango, para cada ave abatida são gastos cerca de 30 L de água em todo o processo, desde a entrada do animal até a expedição do produto final, abrangendo, por exemplo, a limpeza de equipamentos, máquinas e instalações (DE MORAIS; COHIM, 2022).

Para o tratamento de efluentes de abatedouros avícolas ainda não são muito utilizadas propostas alternativas. Sendo assim, o presente trabalho visa estudar a aplicação da digestão anaeróbia simultânea ao tratamento enzimático como uma opção de tratamento desse tipo de efluente.

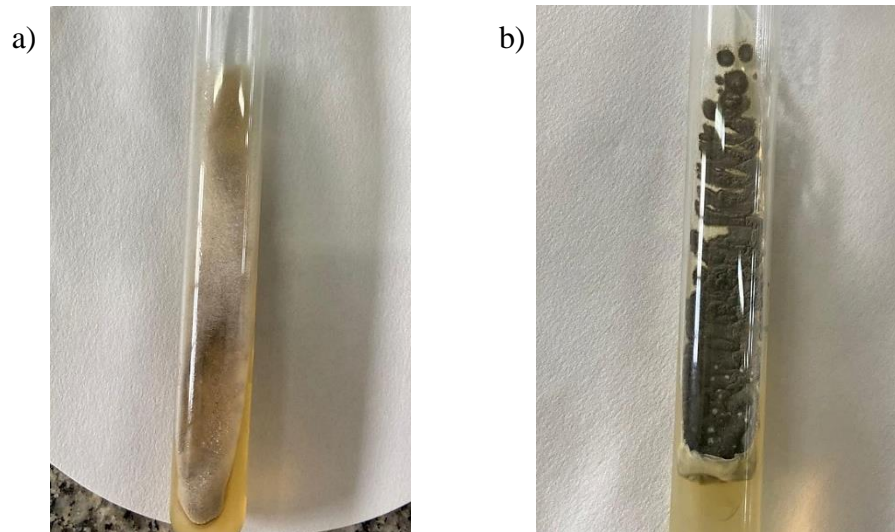
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Microrganismos

Neste trabalho foram utilizados os fungos *Aspergillus oryzae* (URM 5638), apresentado na figura 5a, e *Penicillium citrinum* (URM 4216), apresentado na figura 5b, ambos fornecidos pelo Instituto de Microbiologia de Recife, localizado na Universidade Federal de Pernambuco (Recife/PE, Brasil). Os fungos foram armazenados em tubos de ensaio contendo o meio BDA (Batata Dextrose Agar), conforme apresentado Figura 5 (a e b), sob refrigeração e repicados sempre que necessário.

Figura 5 - Fungos utilizados no desenvolvimento do trabalho



Fonte: própria autora.

Legenda: a) Fungo *Aspergillus oryzae* (URM 5638); b) Fungo *Penicillium citrinum* (URM 4216).

4.1.2 Meio de Cultura

Para a formulação do meio de cultura para fermentação submerso foram utilizados subprodutos da indústria de alimentos como fonte de nutrientes, sendo eles: okará (proveniente da indústria de soja – fornecido por produtores de tofu de Poços de Caldas-MG), bagaço de malte (indústria cervejeira – fornecido por cervejarias de Poços de Caldas-MG) e soro de queijo (indústria de laticínios – fornecido por indústrias de Poços de Caldas-MG). Utilizou-se, também, óleo residual (fonte doméstica - Poços de Caldas – MG) como principal fonte de carbono e indutor da produção de lipase pelos fungos no meio. Além dos subprodutos, o meio foi suplementado com os sais NaNO_3 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, conforme adaptado de

Ferreira *et al.* (2021).

4.1.3 Efluente de abatedouro avícola

Para a etapa de metanogênese, utilizou-se um efluente fornecido por um abatedouro avícola localizado na cidade de Itapira-SP.

4.1.4 Lodo anaeróbio

Para o desenvolvimento da metanogênese, utilizou-se um lodo cedido pelo Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento (CePTS) da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado em Belo Horizonte-MG, onde era aplicado em um reator metanogênico de fluxo ascendente para o tratamento de esgoto doméstico.

4.1.5 Reagentes

A Tabela 1 apresenta os reagentes utilizados durante os ensaios realizados neste trabalho, com suas respectivas marcas e grau de pureza.

Tabela 1 - Reagentes utilizados durante o estudo.

REAGENTE	MARCA	GRAU DE PUREZA
Azeite de Oliva Extra Virgem	Carbonell (mercado local)	-
Goma Arábica Pó Pura	Synth	-
Álcool Etílico Absoluto P.A.	Êxodo Científica	99,80%
Hidróxido de Potássio P.A.	Neon	85%
Ácido Bórico	Synth	99,5%
Cloreto de Potássio	Synth	99%
Nitrato de Sódio P.A.	Synth	99%
Fosfato de Potássio Monobásico Anidro P.A.	Synth	99%
Sulfato de Magnésio (7H ₂ O) P.A.	Synth	98 - 102%
Fosfato de Sódio Bibásico Anidro P.A.	Vetec	99,5%
Hidróxido de Sódio	Fisher Scientific	98,86%
Hexano P.A.	Neon	-

Fonte: própria autora.

4.2 EQUIPAMENTOS

Na Tabela 2, está apresentada a relação de equipamentos utilizados ao longo desse trabalho, com suas respectivas marcas e modelos.

Tabela 2 - Equipamentos utilizados durante a execução do presente trabalho.

EQUIPAMENTO	MARCA	MODELO
Incubadora Shaker	SOLAB	SL – 222
Autoclave Vertical	PRISMATEC	CS
Cabine de Segurança Biológica	PACHANE	PA 040
Incubadora Shaker Refrigerada	SOLAB	SL – 223
Estufa com Circulação e Renovação de Ar	SOLAB	SL - 102/1000
Balança Analítica	MARTE CIENTÍFICA	ATY224
Banho Sorológico	SOLAB	SL – 151
Forno Mufla	NOVA	NI 1385
Centrífuga	SOLAB	SL-700
Rota Evaporador	LOGEN SCIENTIFIC	LSRE-52CS-BA
Digestor	MACHEREY-NAGEL	SN NV40951
Espectrofotômetro	MACHEREY-NAGEL	SN NVIS1324

Fonte: própria autora.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Preparo do meio de cultura e dos biocatalisadores

Baseado em Ferreira *et al.* (2021), foram definidas formulações para o meio de cultura. A Tabela 3 apresenta a formulação referente a cada subproduto utilizado para a elaboração de 1 litro de meio de cultura.

Tabela 3 - Formulação de 1 litro do meio de cultura para cada subproduto agroindustrial utilizado como fonte de nutrientes.

MEIO	SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL	MASSA DO SUBPRODUTO (g)	VOLUME DE SUBPRODUTO (L)	ÁGUA (L)	NaNO₃ (g)	KH₂PO₄ (g)	MgSO₄.7H₂O (g)	ÓLEO RESIDUAL (g)
<i>M1</i>	Okará	70,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,50	30,00
<i>M2</i>	Bagaço de Malte	70,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,50	30,00
<i>M3</i>	Soro de Queijo	0,00*	1,00	0,00	1,00	1,00	0,50	30,00

Fonte: própria autora.

* Para o preparo do meio contendo soro de queijo, utilizou-se 1 litro do soro e não 1 litro de água, uma vez que este é líquido.

Para o meio de cultura contendo okará ou bagaço de malte, primeiro preparou-se um extrato desses subprodutos, uma vez que possuem nutrientes insolúveis em água. Assim, utilizou-se 70 g do subproduto em 1 litro de água destilada pré-aquecida à 31°C, visando facilitar a dissolução, conforme descrito na tabela 4. Essa mistura foi agitada por 20 min à 12 rpm e, após decorrido esse tempo, foi filtrada à vácuo e o extrato obtido foi utilizado no preparo do meio de cultura conforme descrito abaixo. Para o okará a solubilidade obtida foi de 17,32% e para o bagaço de malte 22,62%.

Para o preparo dos biocatalisadores (células íntegras), aplicou-se a metodologia adaptada de Alves *et al.* (2019), onde o meio de cultura líquido elaborado conforme a formulação apresentada acima foi autoclavado à 121°C por 20 min para a realização do cultivo submerso. No preparo do inóculo, o fungo foi levemente raspado sob suspensão de 10 mL água estéril até a obtenção de um meio turvo. Um volume de 0,3 mL, contendo aproximadamente 10^7 esporos do microrganismo, foi inoculado em 100 mL do meio de cultura, que foram incubados à 30°C e 170 rpm por 72h em uma incubadora de agitação orbital (Marca Solab: SL-222). Após o período de incubação, realizou-se a filtração a vácuo no funil de *Buchner*, separando a biomassa produzida do caldo fermentado. A biomassa foi lavada com água destilada até que o filtrado tivesse aspecto cristalino, seca por prensagem manual sob um papel absorvente, embalada e armazenada sob refrigeração para testes posteriores.

4.3.2 Atividade hidrolítica

Seguindo a metodologia adaptada de Andrade *et al.* (2014), através da hidrólise de emulsão de azeite de oliva foi mensurada a atividade hidrolítica da lipase. Para isso, prepararam-se 5 mL de um substrato contendo 10% (v/v) de azeite de oliva e 90% (v/v) de goma arábica a 3% (m/v). Em seguida, foram adicionados ao substrato, 4 mL de tampão fosfato pH 7,0 e essa mistura foi agitada vigorosamente até ficar homogênea, formando uma emulsão. Para quantificar a atividade hidrolítica, nesta emulsão adicionou-se 0,3g (massa seca) de biomassa contendo lipase ligada ao micélio ou 0,5 mL do caldo fermentado. Os frascos foram levados à uma incubadora shaker à 37°C e 120 rpm por 10 minutos. Finalizado o período de incubação, interrompeu-se a reação com a adição de 10 mL de uma mistura etanol e água (1:1). Através do método de titulação direta, realizou-se a titulação dos ácidos graxos liberados no meio, tendo uma solução de KOH (0,020 M) como titulante e fenolftaleína como indicador. Definiu-se que uma unidade de atividade enzimática (U), nas condições reacionais à 37°C, é igual a quantidade de biocatalisador seco que libera 1µmol de ácido graxo livre por um minuto e o cálculo de atividade foi realizado através da Equação 1.

$$\text{Atividade hidrolítica} = \frac{(V1-V2)*M*10^3}{t*m} \quad (1)$$

Onde: Atividade hidrolítica (U/g ou U/mL); V1 (mL) é p volume de KOH gasto na titulação da amostra; V2 (mL) é o volume de KOH gasto na titulação do branco; M (M) é a molaridade da solução de KOH utilizada; t (min) é o tempo de reação; m (g ou mL) é a massa da amostra de biomassa ou o volume da amostra de caldo fermentado.

4.3.3 Teor de umidade

Para definir a quantidade de biomassa seca a ser utilizada, é necessário determinar sua umidade. Assim, o teor de umidade (%) foi determinado com base no método adaptado do Instituto Adolfo Lutz (2008). Esse método consistiu no preparo prévio dos cadinhos, colocando-os para secar em uma estufa à 105°C por 24 h. Após preparados, os cadinhos foram transferidos para um dessecador até esfriarem completamente e sua massa inicial foi mensurada. Em seguida, nos cadinhos já frios, adicionou-se 0,15 g da amostra de biomassa úmida a ser determinado o teor de umidade e estes foram levados à estufa por 24 h sob uma temperatura de 105°C. Ao final do tempo a massa final do cadinho mais a amostra seca foi determinada e o teor de umidade calculado conforme a Equação 2.

$$\text{Teor de umidade [\%]} = \frac{(m_{ai}-m_{af})}{m_{ai}} * 100 \quad (2)$$

Onde: m_{ai} (g) é a massa inicial da amostra (antes da estufa); m_{af} (g) é a massa final da amostra (após a estufa).

A massa final da amostra (m_{af}) foi determinada através da Equação 3.

$$m_{af} = m_{fc} - m_{ic} \quad (3)$$

Onde: m_{fc} (g) é a massa final do cadinho (após a estufa e com a amostra); m_{ic} (g) é a massa inicial do cadinho (após a estufa e sem a amostra).

4.3.4 Obtenção da curva de crescimento microbiano

Para determinar o tempo ideal de cultivo para o fungo, realizou-se a obtenção da sua curva de crescimento. Para isso, foi preparado o meio de cultura, em duplicata, conforme descrito na seção 4.3.1 para a melhor condição obtida após os ensaios realizados conforme descrito na mesma seção. A curva foi obtida para um total 144 h, onde as amostras foram retiradas a cada 24 h e mensuradas sua atividade hidrolítica, conforme a metodologia descrita na seção 4.3.2, e sua massa total de biomassa produzida.

4.3.5 Caracterização quanto aos parâmetros bioquímicos da enzima

4.3.5.1 Determinação do pH e temperatura ótimos de atuação da enzima produzida

Para determinar o melhor pH de atuação da lipase ligada ao micélio produzida, utilizou-se soluções de tampão fosfato com pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0 e soluções de tampão borato com pH 8,5 e 9,0. Essas soluções foram aplicadas ao método da atividade hidrolítica descrito na seção 4.3.2 para determinar a faixa de pH ótimo da lipase com temperatura de operação do shaker fixa em 37 °C.

Após determinado o pH ótimo, realizou-se o mesmo teste utilizando o tampão com o pH obtido e variando a temperatura do shaker, a fim de verificar a faixa na qual a enzima lipase apresenta uma maior atividade hidrolítica. Os valores de temperatura avaliados foram: 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 60°C.

4.3.5.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi determinada com base na adaptação da metodologia descrita por Marotti (2016), onde foram preparadas amostras contendo 0,3g de biomassa seca. Esta foi incubada em 4 mL do tampão fosfato com pH ótimo pré-definido por 24 horas em um banho termostaticado sob diferentes temperaturas, sendo elas 40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 60°C. As amostras foram retiradas nos tempos 4h, 8h, 18h e 24h. Após o período de incubação, as amostras receberam 5 mL da emulsão contendo o substrato descrito na seção 4.3.2, e determinou-se as atividades hidrolíticas conforme o método descrito na mesma seção.

4.3.5.3 Teste de armazenamento da biomassa

Para observar o comportamento da enzima, a biomassa contendo lipase ligada ao micélio foi submetida à armazenamento. Assim, parte da biomassa contendo a enzima foi congelada à aproximadamente -6°C por 2 meses e após esse período foi descongelada e sua atividade hidrolítica foi mensurada. Outra parte foi apenas guardada sob refrigeração de aproximadamente 5°C por 2 meses e após esse período foi mensurada sua atividade hidrolítica conforme a metodologia descrita na seção 4.3.2, utilizando os parâmetros ótimos determinados para a enzima produzida.

4.3.6 Caracterização físico-química dos resíduos

4.3.6.1 Teor de sólidos

Para determinar o teor de sólidos, foram realizadas análises com base na adaptação da

metodologia descrita por APHA (2017), onde para determinação dos sólidos totais, preparou-se previamente os cadinhos, calcinando-os no forno mufla por 15 min à 550°C. Após calcinação, os cadinhos foram levados à estufa com temperatura de 103°C para resfriamento e em seguida foram transferidos para um dessecador até atingirem a temperatura ambiente. Após o total resfriamento, aferiu-se a massa de cada cadinho (m_1). Em seguida, inseriu-se em cada cadinho o volume/massa da amostra a ser analisada, conforme apresentado na tabela 5, e foi aferida a massa do conjunto recipiente e amostra (m_2). Após esse procedimento, os recipientes contendo as amostras foram levados à estufa por 24h à 103°C. Decorrido o tempo, as amostras foram resfriadas no dessecador até temperatura ambiente e aferidas as massas (m_3).

Tabela 4 - Volume/massa das amostras utilizado na análise de sólidos.

AMOSTRA	VOLUME (mL)	MASSA (g)
Efluente Avícola	50,00	-
Lodo anaeróbio	20,00	-
Biomassa (células íntegras)	-	0,25

Fonte: própria autora.

Para determinação do teor de sólidos fixos e voláteis, após o procedimento descrito anteriormente, as amostras foram levadas ao forno mufla por 15 min à 550°C, em seguida foram resfriadas na estufa à 103°C e posteriormente, para atingir a temperatura ambiente, foram colocadas no dessecador. Em seguida foram mensuradas as massas das amostras (m_4). Cada teor de sólidos foi calculado conforme as equações 4, 5 e 6.

$$\%ST = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} * 100 \quad (4)$$

$$\%SF = \frac{(m_3 - m_4)}{(m_3 - m_1)} * 100 \quad (5)$$

$$\%SV = \frac{(m_4 - m_1)}{(m_3 - m_1)} * 100 \quad (6)$$

Onde: %ST é o teor de sólidos totais; %SF é o teor de sólidos fixos; %SV é o teor de sólidos voláteis; m_1 (mg) é a massa do recipiente; m_2 (mg) é a massa do recipiente com a amostra (úmida); m_3 (mg) é a massa do recipiente com a amostra de resíduo seco após retirada da estufa; m_4 (mg) é a massa do recipiente com a amostra após retirada do forno mufla.

Pode-se, também, determinar a concentração de sólidos totais, fixos e voláteis através das equações 7, 8 e 9.

$$ST \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(m_3 - m_1)}{V} \quad (7)$$

$$SF \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(m_4 - m_1)}{V} \quad (8)$$

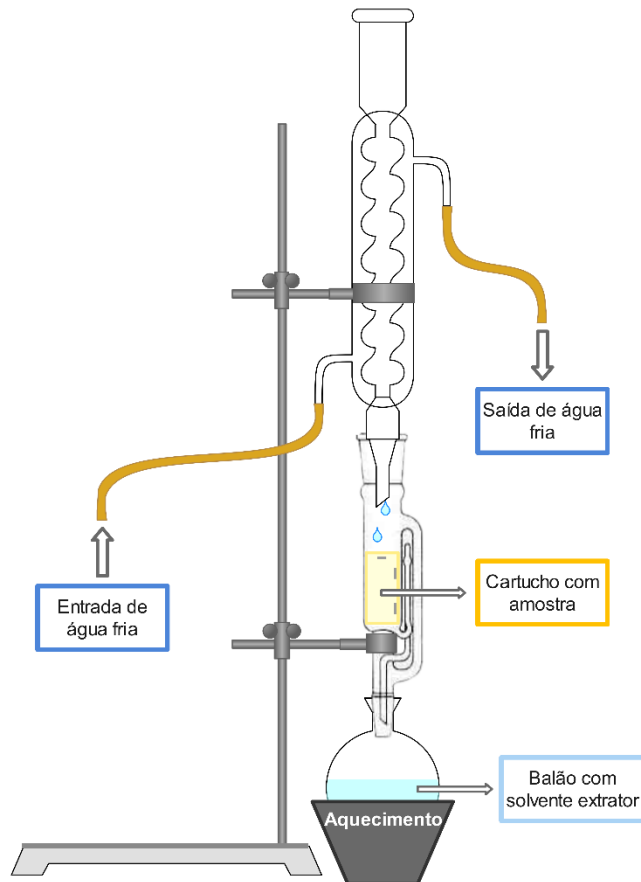
$$SV \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(m_3 - m_4)}{V} \quad (9)$$

Onde: ST (mg/L) é a concentração de sólidos totais; SF (mg/L) é a concentração de sólidos fixos; SV (mg/L) é a concentração de sólidos voláteis; m_1 (mg) é a massa do recipiente; m_3 (mg) é a massa do recipiente com a amostra de resíduo seco após retirada da estufa, m_4 (mg) é a massa do recipiente com a amostra após retirada do forno mufla; V m(L) é o volume de amostra utilizado.

4.3.6.2 Teor de lipídios

Para determinar o teor de lipídios presente no efluente estudado, foi realizada a extração direta em Soxhlet com base na metodologia adaptada de Instituto Adolfo Lutz (2008). Para isso, inicialmente preparou-se as amostras, em triplicata, da seguinte forma: colocou-se uma porção de algodão sobre duas folhas de papel filtro, em seguida foi despejado sobre o algodão um volume de 100 mL do efluente. Essas amostras no algodão foram colocadas em cartuchos de papel filtro previamente preparados e em seguida os cartuchos foram fechados e levados ao equipamento Soxhlet. Os balões de fundo redondo a serem utilizados na extração foram previamente pesados e em seguida foi inserido em cada um 150 do solvente extrator n-hexano; estes foram acoplados ao restante do sistema, conforme a figura 6. Montado todo o sistema, ligou-se o aquecimento e após o início da ebulição, a extração foi conduzida por 4 horas.

Figura 6 - Esquema de extração Soxhlet



Fonte: própria autora.

Terminado o tempo de extração, o solvente foi destilado em um rotaevaporador até total recuperação do solvente. Em seguida, aferiu-se a massa final do balão contendo a amostra e o teor de lipídios calculado conforme a equação 10:

$$\%Lipídios = \frac{m_f}{m_i} * 100 \quad (10)$$

Onde m_f (mg) é a massa final do balão com a amostra de lipídios retida; m_i (mg) é a massa inicial do balão vazio.

Pode-se determinar, também, a concentração de lipídios através da equação 11.

$$Lipídios \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{m_f - m_i}{V} \quad (11)$$

Onde m_f (mg) é a massa final do balão com a amostra de lipídios retida; m_i (mg) é a massa inicial do balão vazio; V (L) é o volume de amostra utilizado.

4.3.6.3 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Para análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi realizada a análise com base

em *Standard Methods* (APHA, 1998), onde, inicialmente, em triplicata, foram inseridos com o auxílio de uma micropipeta 1,25 mL da amostra em tubos próprios para digestão, sendo diluídas em caso de amostras muito concentradas. Também foi preparado um branco contendo água destilada no lugar da amostra. Em seguida, nesses tubos foram inseridos, com o auxílio de dispensadores automáticos, 0,75 mL de dicromato de potássio e, vagarosamente, 1,75 mL da solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico concentrado. Preparadas as amostras, os tubos foram fechados e, com cuidado, foram homogeneizadas as amostras. Em seguida, um digestor foi previamente aquecido à 150°C e as amostras inseridas nele para digestão por 2 h. Após finalizada esta etapa e total resfriamento das amostras, estas foram levadas à espectrofotômetro, procedendo-se a leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 620 nm. A concentração de DQO foi determinada conforme a curva de calibração do equipamento, descrita na equação 12.

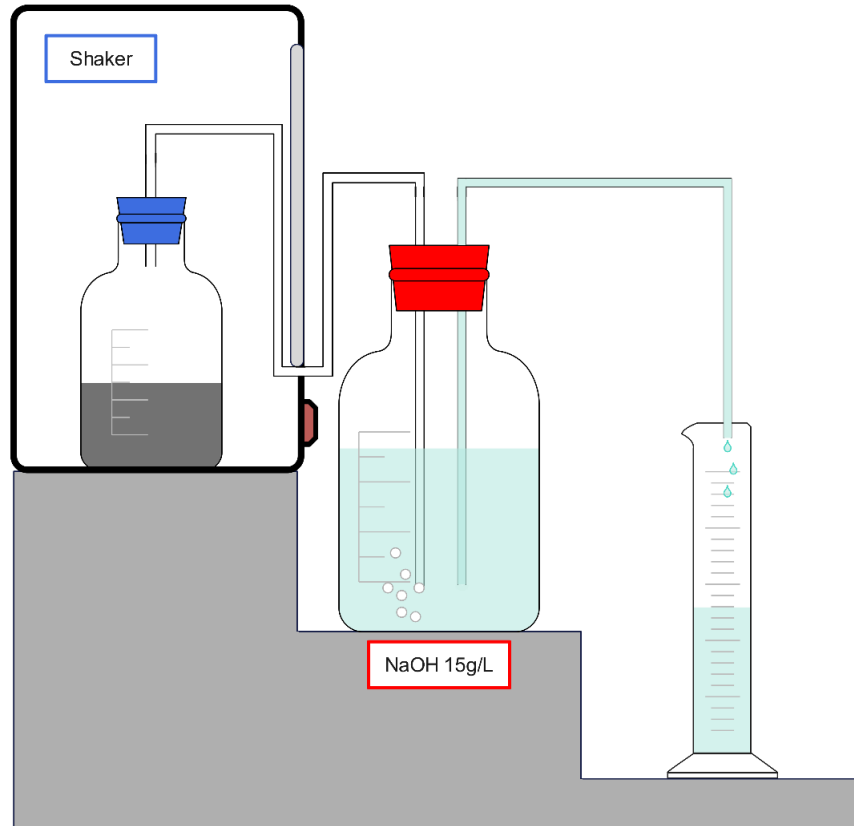
$$x = \left(\frac{y+0,0154}{0,0004} \right) * \left(\frac{1}{d} \right) \quad (12)$$

Onde: x (mg/L) é a DQO; d é o fator de diluição; y é a absorbância.

4.3.7 Ensaio de Metanogênese

Os ensaios de Atividade Metanogênica Específica (AME) foram realizados conforme a metodologia adaptada de Alves *et al.* (2019) e em triplicata, a fim de avaliar a biodegradabilidade anaeróbia do efluente de abatedouro avícola. O sistema foi montado conforme apresentado na figura 7, onde utilizou-se reatores tipo batelada, sendo eles frascos Duran[®] de 250 mL contendo 50 mL do efluente, com pH corrigido para 7 mediante a adição de bicarbonato de sódio, 15 mL do lodo anaeróbio e 2 g de biomassa seca com lipase ligada ao micélio. Esses reatores foram vedados hermeticamente e levados à uma incubadora shaker à 30°C e 100 rpm. Para análise da produção de biogás, os reatores foram ligados à um outro frasco Duran[®] de 500 mL localizado do lado externo da incubadora shaker, contendo 400 mL de solução NaOH 15g/L. O frasco externo foi fechado hermeticamente, possuindo uma entrada para o gás proveniente dos reatores batelada e uma saída para a solução de NaOH à medida que o gás era produzido. Essa saída para NaOH estava acoplada a uma proveta de 100 mL, onde foi possível determinar a produção de gás através do deslocamento de NaOH e a variação de volume na proveta. O ensaio ocorreu até esgotamento da produção de gás, ou seja, não haver mais variação no volume na proveta e a solução de NaOH começar a se direcionar aos reatores.

Figura 7 - Sistema para ensaio de Atividade Metanogênica Específica



Fonte: própria autora.

Após finalizado o ensaio, cada amostra foi centrifugada à 3000 rpm por 7 minutos e em seguida o sobrenadante foi recolhido para aferição do pH e análises de DQO.

4.3.7.1 Equação modificada de Gompertz

Após obtidos os resultados dos ensaios de AME, estes foram ajustados conforme a equação de Gompertz modificada (ALVES *et al.*, 2019) e analisados utilizando a ferramenta *solver* no Excel. Assim, para cada uma das condições avaliadas, conforme apresentado na tabela 6 da seção 5.3.7.2, obteve-se através da equação 13 os seguintes parâmetros: a taxa máxima de produção de metano (R_m), o tempo da fase de adaptação (λ) – fase *lag* – e a produção máxima de metano (mL).

$$H = P * \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m * e}{P} * (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (13)$$

Onde: H é o volume de metano gerado (mL) em função do tempo (h); P (mL) é a produção máxima de metano do teste; R_m (mL/h) é a taxa máxima de produção de metano; λ (h) é o tempo da fase de adaptação (fase *lag*).

4.3.7.2 Análise estatística das variáveis na atividade metanogênica específica

A fim de analisar a influência de alguns parâmetros na AME, realizou-se o planejamento fatorial completo 2^3 , para as variáveis temperatura (X_1), agitação (X_2) e pH inicial (X_3), conforme apresentado na tabela 5, tendo um total de 8 experimentos, todos eles realizados em triplicatas. Assim, tem-se um fator de reprodutibilidade de 3 para cada ensaio. Para a variável temperatura, o nível -1 é referente à temperatura ambiente, fixada em 25°C e o nível +1 referente à temperatura de 30°C. Na variável agitação, foi estudada a influência da sua presença no ensaio, sendo assim, o nível -1 se refere ao meio sem agitação e o nível +1 com agitação de 100 rpm. Por fim, para a variável pH inicial, foi estudada a influência do pH natural do meio, de 6,6 como o nível -1 e o pH corrigido com bicarbonato de sódio para o valor de 7,0, como o nível +1.

Tabela 5 – Matriz de planejamento fatorial completo 2^3

ENSAIOS	NÍVEIS CODIFICADOS			VALORES REAIS		
	X1	X2	X3	TEMPERATURA (°C)	AGITAÇÃO (rpm)	pH inicial
<i>A1</i>	- 1	- 1	- 1	25	0	6,60
<i>A2</i>	+ 1	- 1	- 1	30	0	6,60
<i>A3</i>	- 1	+ 1	- 1	25	100	6,60
<i>A4</i>	+ 1	+ 1	- 1	30	100	6,60
<i>A5</i>	- 1	- 1	+ 1	25	0	7,00
<i>A6</i>	+ 1	- 1	+ 1	30	0	7,00
<i>A7</i>	- 1	+ 1	+ 1	25	100	7,00
<i>A8</i>	+ 1	+ 1	+ 1	30	100	7,00

Fonte: própria autora.

Após realizados os ensaios para o planejamento experimental, os dados foram tratados no software Protimiza (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DA ESPÉCIE DE FUNGO E MEIO DE CULTURA COM MAIOR POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE LIPASE LIGADA AO MICÉLIO

Inicialmente, foi realizada a determinação de qual espécie de fungo filamentoso combinado à um subproduto agroindustrial apresentava um maior potencial para produção de lipase ligada ao micélio. Para isso, foi realizada a produção a partir das espécies *A. oryzae*, *P. citrinum* e da combinação de ambas. Essa combinação de espécies foi testada visando analisar a possibilidade de uma maior produção de lipase ligada ao micélio quando combinados os fungos. Para cada uma das espécies foram realizados testes com diferentes fontes de nutrientes provenientes da indústria de alimentos, sendo elas, os subprodutos: okará, bagaço de malte e soro de queijo, com formulação do meio de cultura conforme apresentado na tabela 3 da seção 4.3.1. Assim, os cultivos foram realizados em triplicata e obtiveram-se os valores médios de pH inicial e final do filtrado, concentração de biomassa após 72h de cultivo e a atividade hidrolítica do micélio e filtrado conforme apresentado na tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios de concentração de biomassa seca produzida por litro de meio de cultura, pH inicial e final do cultivo, atividade do micélio e atividade do filtrado após 72h de cultivo submerso para cada meio de cultura.

MEIO DE CULTURA	ESPÉCIE	CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA (g/L)	PH INICIAL DO CULTIVO	pH FINAL DO CULTIVO	ATIVIDADE DO MICÉLIO (U/g)	ATIVIDADE DO FILTRADO (U/mL)
M1	<i>A. oryzae</i>	7,23 ± 0,01	5,17 ± 0,01	6,58 ± 0,06	51,61 ± 10,43	4,83 ± 0,43
	<i>P. citrinum</i>	10,85 ± 0,22	5,17 ± 0,01	5,59 ± 0,04	37,41 ± 6,34	2,35 ± 0,69
	<i>A. oryzae</i> + <i>P. citrinum</i>	7,35 ± 0,00	5,17 ± 0,01	6,54 ± 0,01	25,74 ± 9,99	3,43 ± 0,27
M2	<i>A. oryzae</i>	18,01 ± 0,14	5,47 ± 0,08	5,76 ± 0,01	30,67 ± 6,75	0,32 ± 0,00
	<i>P. citrinum</i>	15,53 ± 0,17	5,47 ± 0,08	6,38 ± 0,04	14,84 ± 2,10	1,73 ± 0,19
	<i>A. oryzae</i> + <i>P. citrinum</i>	16,42 ± 0,16	5,47 ± 0,08	4,74 ± 0,59	27,10 ± 3,51	2,70 ± 0,19
M3	<i>A. oryzae</i>	14,30 ± 0,04	6,12 ± 0,05	5,26 ± 0,07	9,73 ± 1,54	3,02 ± 0,49
	<i>P. citrinum</i>	30,12 ± 0,29	6,12 ± 0,05	5,67 ± 0,05	10,34 ± 3,34	3,82 ± 0,80
	<i>A. oryzae</i> + <i>P. citrinum</i>	17,22 ± 0,26	6,12 ± 0,05	5,43 ± 0,00	13,66 ± 2,24	3,08 ± 0,57

Fonte: própria autora.

Legenda: M1: meio com okará; M2: meio com bagaço de malte; M3: meio com soro de queijo.

No geral, ao observar os dados obtidos na tabela 6, é possível constatar que tanto o *A. oryzae* quanto o *P. citrinum* produziram lipase ligada ao micélio, mesmo em meios de cultura com diferentes subprodutos agroindustriais como fonte de nutrientes. Contudo, analisando os resultados de atividade do micélio e atividade do filtrado, os subprodutos okará e bagaço de malte se destacam positivamente como aqueles em que a variação desses dois resultados foi maior. Esse comportamento demonstra que, sendo a atividade do micélio para estes subprodutos muito maior que do filtrado, houve uma maior retenção da lipase produzida no micélio. Já com o soro de queijo essa variação foi visivelmente menor, indicando uma menor retenção da lipase no micélio. Sato *et al.* (2019) demonstram um comportamento parecido, onde a atividade da biomassa produzida a partir do fungo *A. oryzae* cultivado com peptona de soja e azeite de oliva apresentou valor superior ao encontrado para o filtrado, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. Analisando a combinação entre os dois fungos utilizados, não houve um destaque em nenhum dos casos estudados quando comparado ao uso destes fungos de forma isolada; contudo os resultados demonstram uma retenção da lipase no micélio, uma vez que, os valores de atividade do micélio foram visivelmente superiores à atividade do filtrado.

Em relação à variação do subproduto utilizado no cultivo, ao comparar os resultados de atividade do micélio e concentração de biomassa obtidos na tabela 6, para o okará (M1), e para o bagaço de malte (M2), é possível perceber que para o subproduto da soja, tanto o *A. oryzae* quanto o *P. citrinum* apresentaram os resultados de atividade do micélio superiores e concentração de biomassa inferiores, quando comparado com os mesmos resultados para o bagaço de malte. Isso pode ser explicado pelos dados obtidos por Ferreira *et al.* (2021) para carboidratos, proteínas e lipídios, que apresentaram para o okará uma maior porcentagem de lipídios e proteínas e menor porcentagem de carboidratos e para o bagaço de malte uma menor porcentagem de lipídios e proteínas e maior porcentagem de carboidratos. Rodrigues (2006), afirmou que a disponibilidade de carboidratos proporciona aos fungos uma facilidade para sintetizar suas proteínas, que é essencial para seu crescimento, e Pinto, Landgraf e Franco (2019) afirmaram que o principal substrato utilizado pelos fungos filamentosos é o carboidrato. Assim, é possível justificar a hipótese de que devido à uma maior facilidade de acesso à fonte de energia e menor quantidade de proteínas para sintetizar, no bagaço de malte os fungos tendem a se desenvolver mais facilmente, com tendência ao crescimento e não à produção de enzimas, uma vez que a energia está mais acessível. Já no okará, a energia necessária para o crescimento está em maior quantidade na forma de lipídios, ou seja, por ser uma molécula maior e de mais difícil acesso, o fungo precisa da lipase para quebrar a gordura e ter acesso à energia para crescer e sintetizar a proteína. Assim, é possível supor que, utilizando um subproduto com

menor quantidade de carboidrato e maior de lipídios e proteínas, o fungo tende a produzir mais lipase ligada ao micélio e apresentar um menor crescimento do que quanto submetido à um meio com menos gordura e proteína e mais carboidrato, favorecendo assim seu crescimento e não a produção de lipase ligada ao micélio. Tem-se, também, expresso na literatura que a fonte de carbono influencia diretamente na produção de células integras, podendo beneficiar ou atrapalhar o crescimento celular (ALVES, 2018).

Ferreira *et al.* (2021) apresentam em seu trabalho a produção de células íntegras a partir do *A. oryzae* e okará, com resultado de atividade do micélio e concentração de biomassa cerca de 3 vezes superior ao resultado obtido nesse trabalho. Isso pode ser justificado pela qualidade do subproduto utilizado, que interfere diretamente no fornecimento de nutrientes para o crescimento do fungo e produção da enzima, além da qualidade do óleo residual utilizado como indutor, que pode favorecer ou não o crescimento microbiano, como visto anteriormente (ALVES, 2018).

Analisando os resultados para o meio contendo soro de queijo (M3) na tabela 6, é possível perceber que tanto o *A. oryzae* quanto o *P. citrinum* não obtiveram grandes resultados de atividade hidrolítica quando comparado aos valores obtidos para os meios M1 e M2. Além disso, é possível notar que há uma concentração de biomassa produzida alta e uma menor atividade. Isso pode ser explicado com base nos dados apresentados por Braz (2019), onde tem-se que o soro de queijo apresenta uma quantidade de carboidratos de 60% dos sólidos totais, proteínas 16% e lipídios 9,5%. Sendo assim, analisando a composição do soro, tem-se a hipótese de que devido à abundância de carboidratos no meio, os fungos tendem a crescer mais, mas não produzir lipase ligada ao micélio.

Comparando os resultados de pH inicial e final dos meios M1, M2 e M3, pode-se notar que para o cultivo com soro de queijo (M3) o pH final ficou mais ácido do que o inicial, diferentemente dos outros dois cultivos. Isso pode ser justificado, segundo a literatura, como um resultado proveniente da produção de ácidos orgânicos. Esses ácidos, além de tornar o pH do meio mais baixo (ácido), podem degradar a enzima produzida, ocasionando uma menor atividade hidrolítica como apresentado nos resultados do meio M3. Isso ocorre, pois alguns microrganismos são responsáveis pela produção desses ácidos, principalmente os fungos, onde estes podem liberar altas concentrações no meio que estão inseridos (ALORI; GLICK; BABALOLA, 2017; DUARTE, 2019).

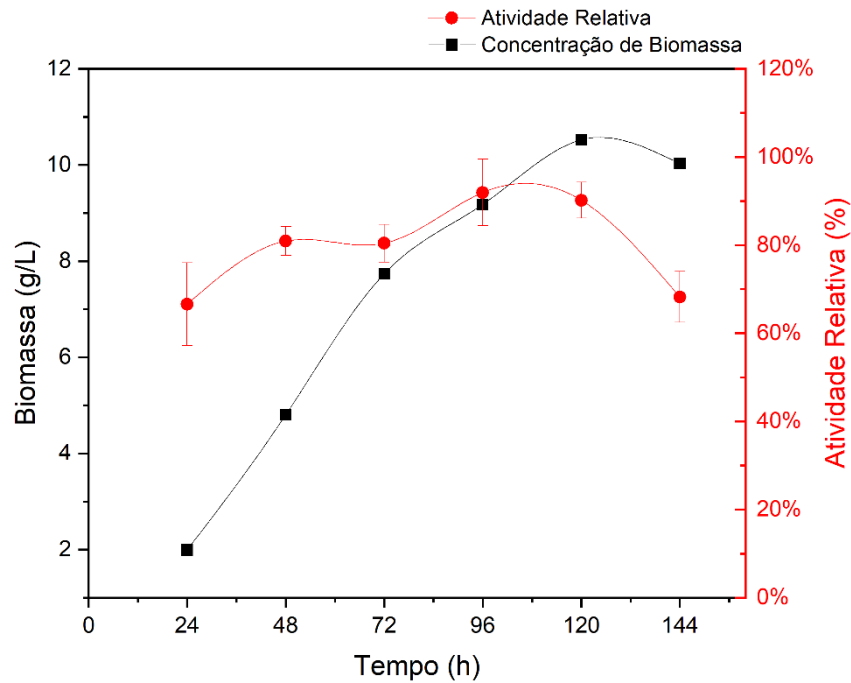
Analisando o resultado de pH inicial, nos meios contendo okará (M1) e no contendo bagaço de malte (M2), onde o pH inicial é mais ácido, a atividade hidrolítica da lipase ligada ao micélio produzida foi maior para o fungo *A. oryzae* do que para o *P. citrinum*. Já no M3 onde

o pH inicial é maior, a atividade relacionada a biomassa obtida através do fungo *P. Citrinum* se destaca como maior. Segundo a literatura, apesar de apresentarem um crescimento e atividade hidrolítica em uma faixa de pH ampla, esses fungos filamentosos apresentam maiores rendimentos quando cultivados em meios mais básicos (ALVES, 2018; SATO *et al.*, 2019; VARDANEGA *et al.* 2010). Contudo pode-se notar nesse estudo que o fungo *A. oryzae* utilizado se destaca em cultivos com um pH mais ácido e o *P. citrinum* em pH mais básico. Assim, pode-se perceber uma adaptabilidade dos fungos utilizados em condições distintas, favorecendo a escolha e aplicação de cada um de acordo com as características do meio no qual será inserido. O fungo que se destacou e foi selecionado para continuidade do trabalho foi o *A. oryzae*, pois produziu lipase ligada ao micélio com maior atividade hidrolítica nas condições estudadas.

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO DO *Aspergillus oryzae*

Para determinar melhor o tempo do cultivo, visando a obtenção de uma maior concentração de biomassa com a maior atividade hidrolítica possível, construiu-se a curva de crescimento do fungo *A. oryzae* utilizado, conforme a metodologia descrita na seção 4.3.4. A Figura 8 apresenta o gráfico contendo a concentração de biomassa produzida em função do tempo e sua respectiva atividade relativa. Essa atividade relativa tem como 100% a maior atividade obtida e as demais são determinadas em porcentagem com relação a ela.

Figura 8 - Valores de biomassa seca produzida e atividade relativa da biomassa em função do tempo de cultivo



Fonte: própria autora.

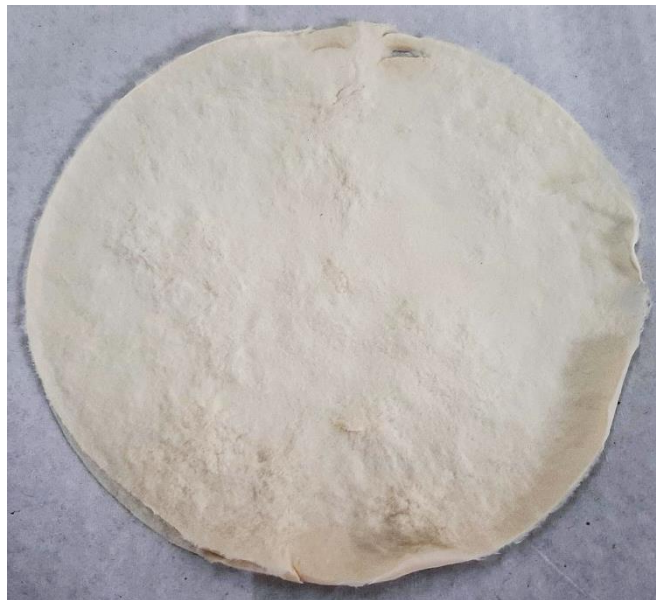
Ao analisar a figura 8, pode-se perceber o crescimento do fungo não apresenta uma fase *lag*, apresentando um valor máximo entre 96h e 144h, onde o pico é de $10,53 \pm 0,08$ g/L em 120h. Lima (2017) apresentou em seu trabalho que, para as células íntegras livres de *P. citrinum*, até 48h não há um crescimento expressivo do fungo, somente após as primeiras 48h. Essa falta expressiva de fase *lag* pode indicar uma maior adaptação do fungo ao meio que foi submetido para o crescimento, favorecendo seu crescimento em um curto tempo. Durante todo o período foi monitorada a atividade hidrolítica da biomassa, que apresentou uma maior atividade relativa entre 96h e 120h de cultivo com valor máximo de $50,22 \pm 4,13$ U/g. Sato *et al.* (2019), apresentam um perfil de crescimento parecido, com picos de crescimento de biomassa entre 96h e 120h e, também, uma maior atividade hidrolítica no mesmo intervalo de tempo. Além disso, trabalhos demonstram que 96 horas é um tempo comum para o cultivo visando a produção de células íntegras, como Lima *et al.* (2019) para o fungo *Penicillium citrinum*, Braz (2019) para o fungo *Mucor circinelloides* e Castro (2018) para o fungo *Aspergillus westerdijkiae*.

Assim, pode-se determinar que o tempo mais adequado de cultivo para esse estudo foi de 96h uma vez que, mesmo apresentando uma menor concentração de biomassa do que em 120h, obteve-se a maior atividade hidrolítica, o que justifica a escolha.

5.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DAS LIPASE PRODUZIDA

Após realizado o cultivo, obteve-se a biomassa com lipase ligada ao micélio (biocatalisador) conforme apresentado na figura 9. Visando-se determinar as condições mais adequadas para a realização da hidrólise pelo biocatalisador produzido pelo fungo *A. oryzae*, foi realizada a caracterização deste quanto aos seus parâmetros bioquímicos, conforme as metodologias apresentadas nas seções 4.3.5.1 e 4.3.5.2.

Figura 9 - Biomassa com lipase ligada obtida pelo *A. oryzae* cultivado no meio contendo okará

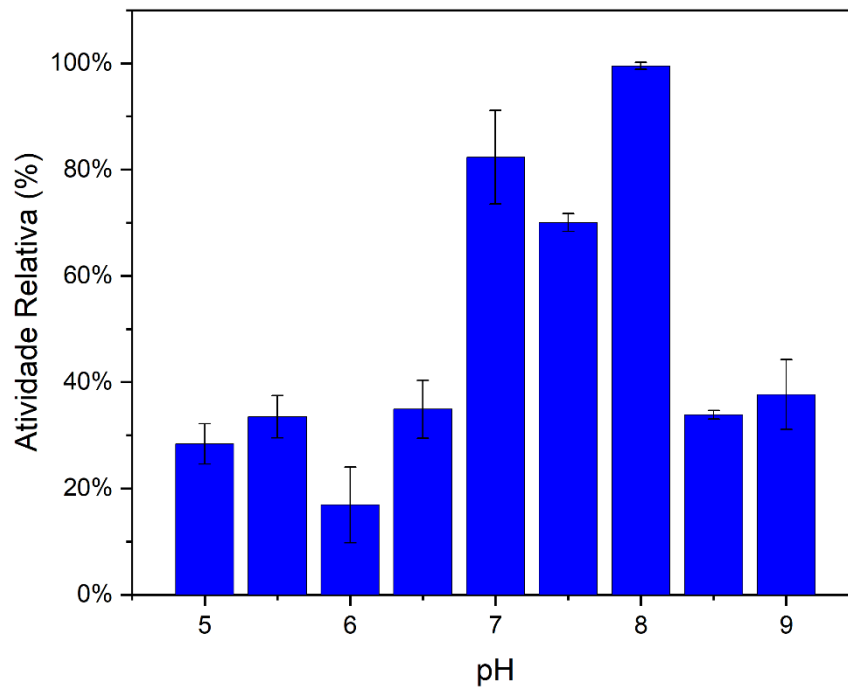


Fonte: própria autora.

5.3.1 Determinação do pH ótimo de atuação da lipase

Após a realização dos ensaios descritos na seção 4.3.5.1, foi possível determinar o comportamento da lipase ligada ao micélio produzida quando aplicada a variação de pH. Esse comportamento pode ser expresso através do gráfico na figura 10, que apresenta a variação da atividade relativa em função do pH.

Figura 10 - Gráfico de barras de pH em função da atividade relativa da lipase ligada ao micélio produzida



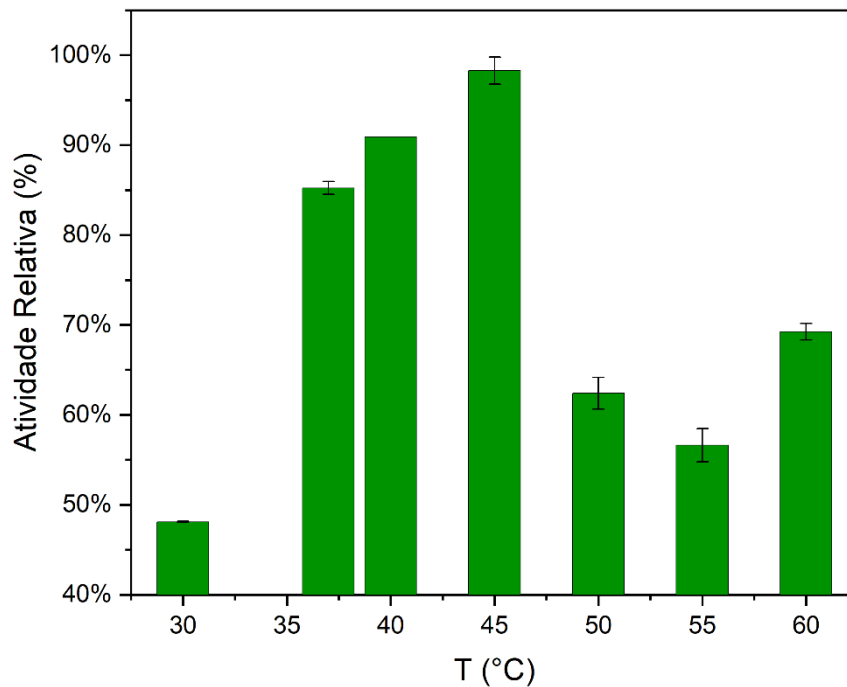
Fonte: própria autora.

Analisando a figura 10, pode-se constatar que, após o pH 6,0, a enzima tem sua atividade relativa crescente, tendo um intervalo de melhor atuação entre os valores de pH 7,0 e 8,0 e em seguida um declínio na atividade, com valor máximo de $45,92 \pm 0,31$ U/g no pH 8. Na literatura, pode-se constatar que esse valor de pH se encontra entre os valores já relatados, que podem variar entre os pH de 4 a 9 (ALVES, 2018; CORTEZ; CASTRO; ANDRADE, 2017; LIMA *et al.*, 2019; MENDES, 2019). Lima (2017) apresentou um resultado semelhante ao obtido neste trabalho, com pH ótimo para lipase ligada ao micélio proveniente do fungo *Penicillium citrinum* entre 7,5 e 8. Braz (2019), em seu trabalho, obteve o pH ótimo num intervalo entre 7 e 8 para o fungo *Mucor circinelloides*. Sato *et al.* (2019) apresenta um pH 8 como ideal para as células íntegras do fungo *Aspergillus oryzae*. Assim, justifica-se a definição do pH 8,0 como o pH ótimo da lipase ligada ao micélio obtida nesse estudo.

5.3.2 Determinação da temperatura ótima da lipase

Após a obtenção do melhor pH de atuação da lipase ligada ao micélio produzida, foi possível determinar sua melhor temperatura. Para isso realizaram-se os ensaios conforme a metodologia descrita na seção 4.3.5.1 e pode-se obter o gráfico de temperatura em função da atividade relativa, conforme apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Gráfico de barras de temperatura em função da atividade relativa da lipase ligada ao micélio produzida



Fonte: própria autora.

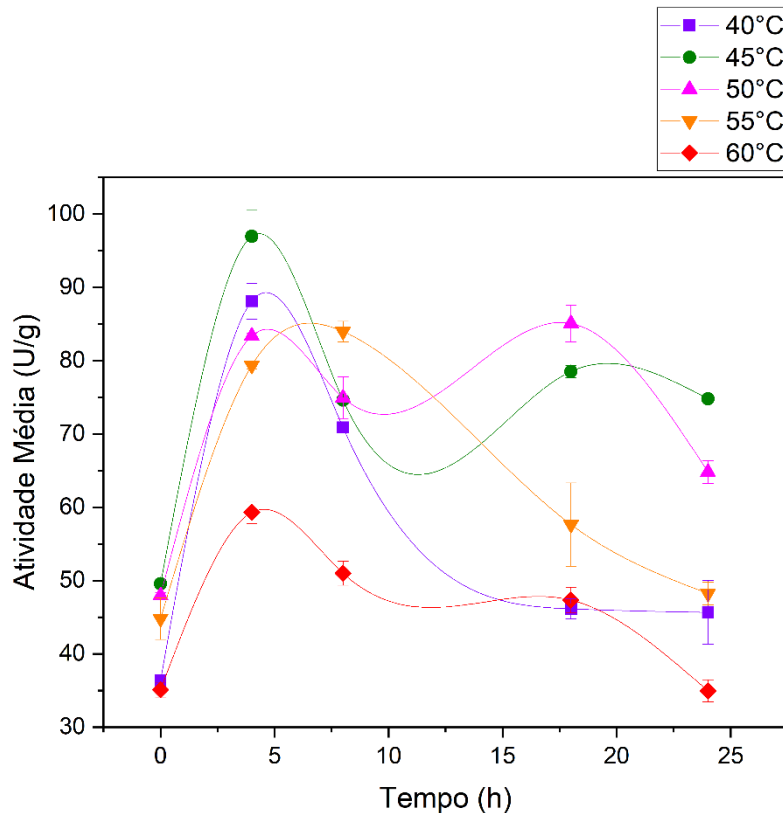
A figura 11 apresenta um crescimento na atividade da lipase até a temperatura de 45°C, tendo um declínio em seguida, com atividade máxima de $50,60 \pm 0,77$ U/g. A literatura afirma que a lipase pode apresentar uma faixa de temperatura para atividade entre ambiente e 70°C (GEOFFRY; ACHUR, 2018; MEHTA; BODH; GUPTA, 2017; MENDES, 2019). Além disso, outros trabalhos relatam uma maior atividade da lipase abrangendo a temperatura de 45°C no seu intervalo, como apresentado por Lima *et al.* (2019) para células íntegras do fungo *Penicillium citrinum* e Braz (2019) para células íntegras do fungo *Mucor circinelloides*. Assim, justifica-se a determinação da temperatura ótima da lipase produzida como 45°C.

Após a temperatura de 45°C, pode-se perceber uma queda de cerca de 40% da atividade da enzima entre 50 e 55°C.

5.3.3 Determinação da estabilidade térmica da lipase

Para a determinação da estabilidade térmica da lipase, realizou-se o ensaio conforme descrito na seção 4.3.5.2 e obtiveram-se as curvas de estabilidade térmica para cada temperatura estudada conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Curvas de estabilidade térmica da lipase para diferentes temperaturas em função do tempo



Fonte: própria autora.

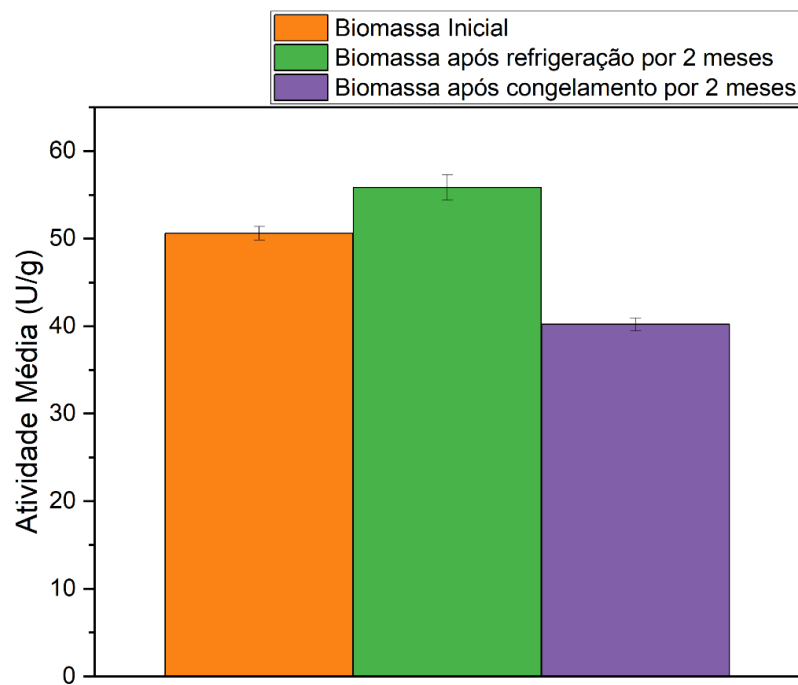
Observando a figura 12 pode-se perceber um comportamento inesperado da enzima quando submetida à diferentes temperaturas por um longo período. Espera-se que após um tempo a atividade hidrolítica da enzima decresça até que não exista mais, configurando a desnaturação dessa enzima, como visto no trabalho de Marotti *et al.* (2016) para lipase ligada ao micélio dos fungos *Penicillium italicum*, *Penicillium janthinellum* e *Penicillium purpurogenum*, também no trabalho de Reis (2021) para lipase ligada ao micélio do fungo *Rhizopus oryzae*. Contudo, nesse caso, observa-se que, para todas as temperaturas estudadas, entre o tempo zero e 4 horas, há um aumento na atividade hidrolítica, sendo em alguns casos o dobro do valor inicial. Com exceção da temperatura de 55°C, nas temperaturas de 40°C, 45°C, 50°C e 60°C, após as 4 primeiras horas há uma queda nessa atividade, sendo que para 40°C e 60°C, essa queda se mantém e para 45°C e 50°C ainda apresentam crescimento considerável e,

em seguida, queda na atividade. Segundo Nascimento (2015), as propriedades das lipases microbianas são muito heterogêneas, em termos de estabilidade em variações de pH e temperatura e na especificidade de acordo com os substratos presentes no meio. Como são utilizadas fontes de nutrientes não comerciais, ou seja, provenientes de subprodutos, pode-se levantar a hipótese de que esse tipo de material no meio de cultura pode proporcionar a produção de células íntegras com essas características quando submetidas às variações de temperatura por um período.

5.4 TESTE DE ESTOCAGEM E ARMAZENAMENTO

Visando estudar a possibilidade de uso da biomassa com lipase ligada ao micélio produzida, após armazenamento, realizou-se os ensaios conforme descrito na seção 4.3.5.3 e obtiveram-se os resultados conforme apresentado na figura 13.

Figura 13 - Comparativo da atividade da lipase ligada ao micélio após armazenamento sob congelamento e refrigeração



Fonte: própria autora.

Observando a figura 13, pode-se perceber que após o congelamento a biomassa perdeu cerca de 20% da sua atividade hidrolítica. Isso pode indicar uma pequena inativação da enzima devido às baixas temperaturas que foi submetida. Quando comparadas as atividades iniciais e após o armazenamento sob refrigeração por 2 meses, a enzima não apresentou uma variação considerável da atividade, isso pode representar a não homogeneidade das enzimas na biomassa. Ao analisar ambos os armazenamentos, pode-se perceber que mesmo após o

congelamento, a lipase ligada ao micélio desse estudo não apresentou uma perda na atividade muito alta, demonstrando que esta apresenta a possibilidade de armazenamento sob congelamento ou apenas refrigeração para uso posterior.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

Foi realizada a caracterização do efluente de abatedouro avícola utilizado quanto as suas concentrações de sólidos, lipídios e DQO, conforme as metodologias descritas nas seções 4.3.6.1, 4.3.6.2 e 4.3.6.3 respectivamente. Assim pode-se obter os resultados conforme apresentado na tabela 7. Obteve-se, também, o valor de pH do efluente, sendo ele 6,60.

Tabela 7 - Dados obtidos da caracterização físico-química do efluente de abatedouro avícola.

LIPÍDIOS (mg/L)	DQO (mg/L)	ST (mg/L)	SF (mg/L)	SV (mg/L)
6686,50 ± 16,76	1430,00 ± 99,22	1073,33 ± 29,69	324,00 ± 36,06	749,33 ± 6,43

Fonte: própria autora.

Legenda: DQO: Demanda Química de Oxigênio; ST: Sólidos Totais; SF: Sólidos Fixos; SV: Sólidos Voláteis.

Ao analisar a tabela 7 tem-se que o efluente estudado apresenta características físico-químicas com valores próximos aos obtidos na literatura. Araujo (2021) apresentou em seu trabalho valores de ST de 2,71 g/L e 3,20 g/L para dois lotes de efluente proveniente de abatedouro avícola no Paraná, cerca de 2 a 3 vezes superior ao visto na tabela 8. A DQO obtida por Araujo (2021) teve valores de 1,19 g/L e 6,12 g/L para os dois lotes, sendo o resultado apresentado na tabela 7, próximo a esses. Araujo (2021) também analisou o pH dos dois lotes do efluente e obteve os valores de 5,70 e 6,27, próximos ao do efluente estudado, que possui pH igual a 6,60.

Liberatti (2018) cita em seu trabalho um estudo que mostra as características de efluentes provenientes de abatedouros avícolas, podendo eles apresentarem DQO entre 500 e 15900 mg/L, pH entre 4,190 e 8,10. Alves (2018) cita um estudo que apresenta a que efluentes de abatedouros podem apresentar concentração de lipídios acima de 500 mg/L. Assim, o efluente utilizado apresenta características que corroboram com a literatura.

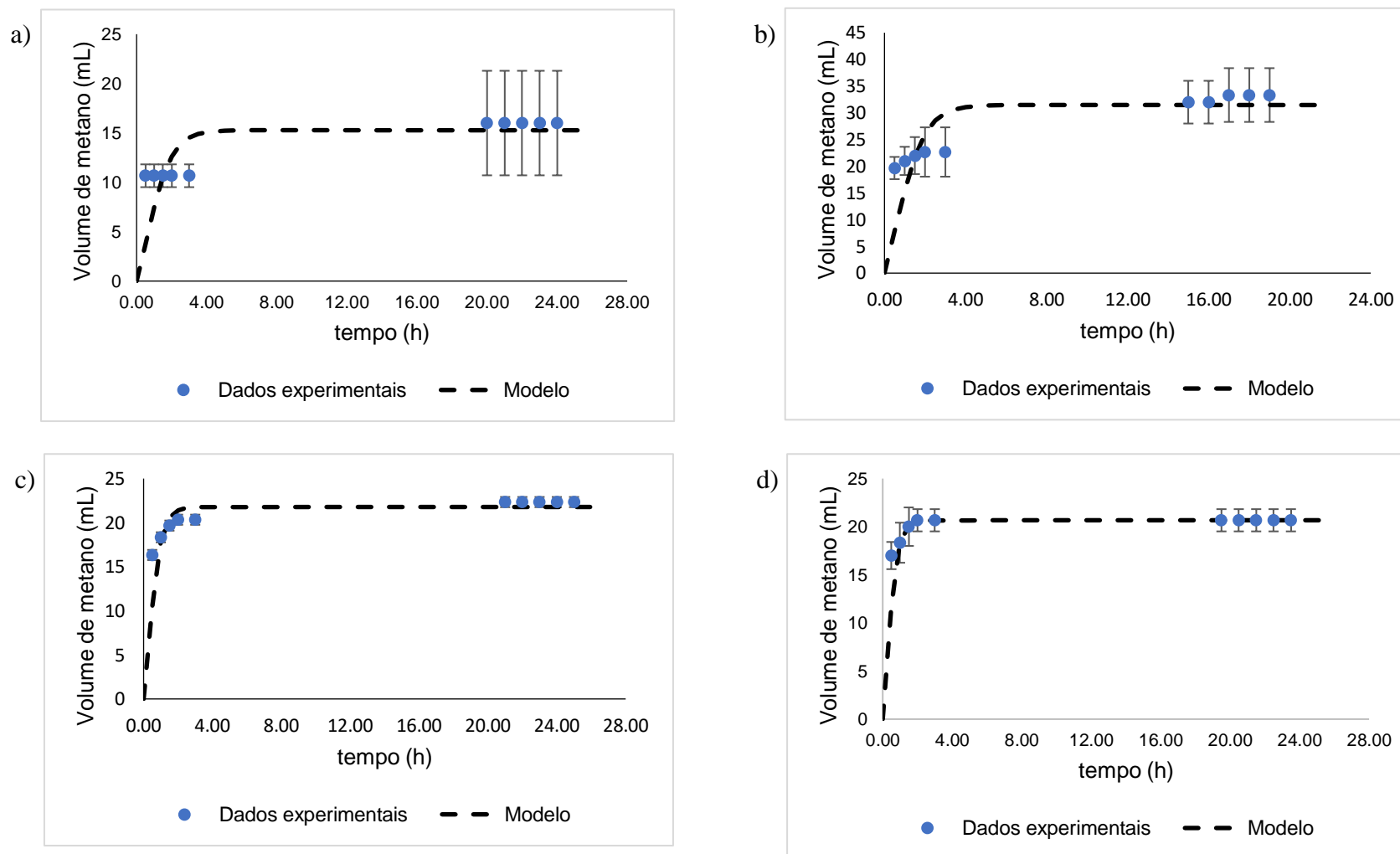
5.6 TESTE DE ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA

A fim de verificar a eficiência do sistema proposto para a produção de biogás, foi realizada a Atividade Metanogênica Específica (AME) conforme a metodologia descrita na seção 4.3.7.

5.6.1 Ensaio de AME conforme o planejamento fatorial completo 2³

A fim de analisar a influência de alguns parâmetros na AME, foram realizados testes conforme descrito na seção 4.3.7.1. Com isso, obteve-se os gráficos de tempo (h) por volume de metano observado (mL) para o planejamento experimental descrito na tabela 5 da seção 4.3.7.2, apresentados nas figuras 14 e 15 e na tabela 8 com os parâmetros obtidos pela equação modificada de Gompertz para cada variação estudada.

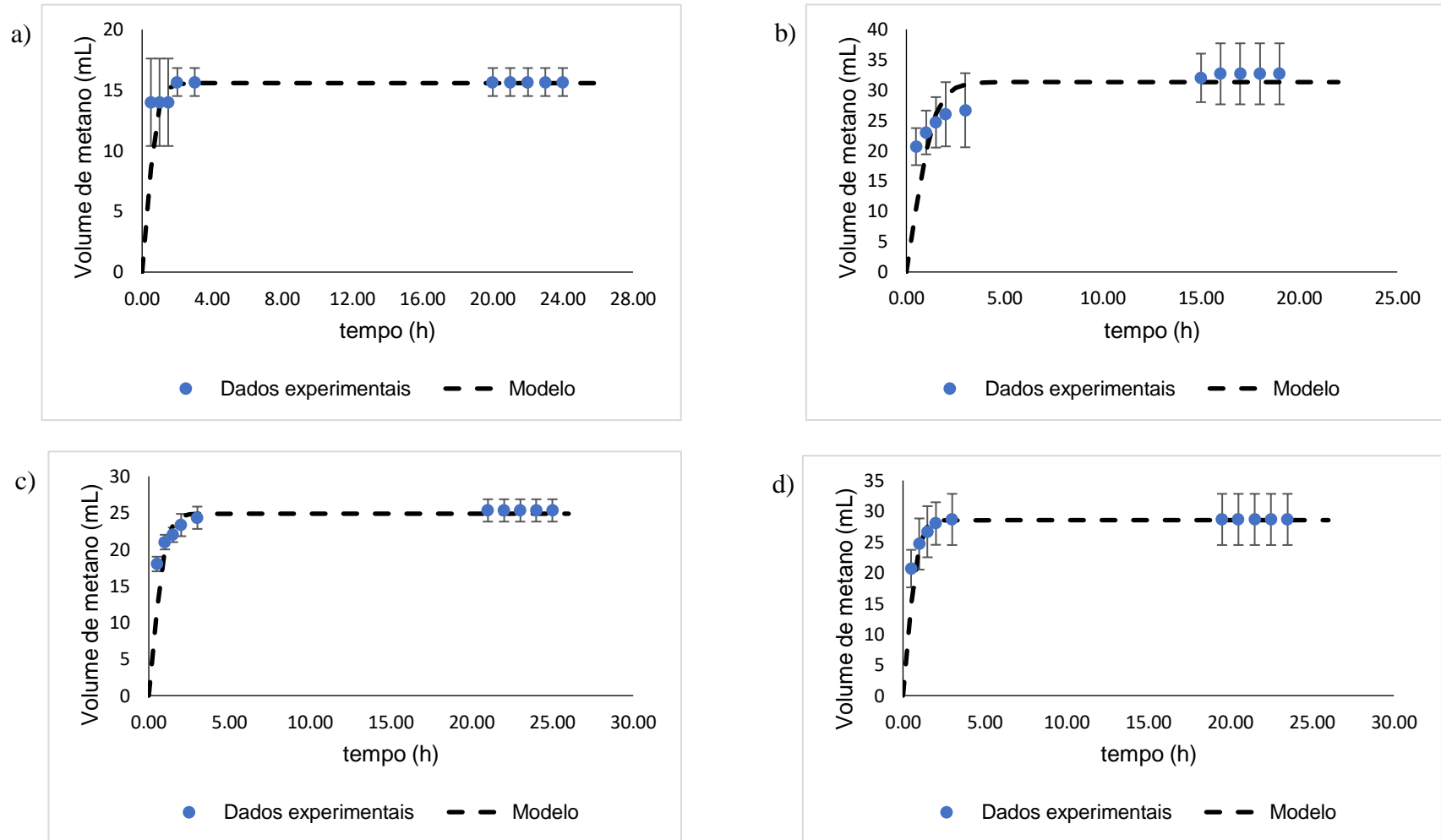
Figura 14 - Gráficos comparativos de tempo por volume de metano observado entre o modelo de Gompertz e os dados experimentais para os testes de AME do planejamento experimental: A1, A2, A3 e A4



Fonte: própria autora.

Legenda: a) amostra A1 (condições: 25°C, sem agitação, pH 6,60); b) amostra A2 (condições: 30°C, sem agitação, pH 6,60); c) amostra A3 (condições: 25°C, agitação de 100rpm, pH 6,60); d) amostra A4 (condições: 30°C, agitação de 100rpm, pH 6,60).

Figura 15 - Gráficos comparativos de tempo por volume de metano observado entre o modelo de Gompertz e os dados experimentais para os testes de AME do planejamento experimental: A5, A6, A7 e A8



Fonte: própria autora.

Legenda: a) amostra A5 (condições: 25°C, sem agitação, pH 7,00); b) amostra A6 (condições: 30°C, sem agitação, pH 7,00); c) amostra A7 (condições: 25°C, agitação de 100rpm, pH 7,00); d) amostra A8 (condições: 30°C, agitação de 100rpm, pH 7,00).

Tabela 8 - Parâmetros modificados do modelo de Gompertz para os ensaios de AME do planejamento experimental e R².

AMOSTRA	Rm (mL/h)	λ (h)	P (mL)	R²
<i>A1</i>	7,48	0,00	15,27	0,62
<i>A2</i>	15,39	0,00	31,46	0,67
<i>A3</i>	20,56	0,00	21,78	0,62
<i>A4</i>	23,60	0,00	20,67	0,75
<i>A5</i>	17,20	0,00	15,58	0,54
<i>A6</i>	20,63	0,00	31,30	0,66
<i>A7</i>	23,21	0,00	24,89	0,64
<i>A8</i>	29,69	0,00	28,55	0,64

Fonte: própria autora.

Primeiramente, ao analisar os gráficos das figuras 14 e 15 e a tabela 8, pode-se perceber que nenhum dos testes apresentou uma fase *lag* pelo modelo de Gompertz, já sendo possível observar uma produção de metano no início dos ensaios. Isso pode supor que a relação entre os microrganismos anaeróbios e as enzimas provenientes das células íntegras seja harmônica, não sendo necessário um tempo de adaptação para o início da produção de metano (ALVES, 2018). Conforme visto na tabela 9, analisando o R² obtido para cada ensaio, os resultados que mais se aproximaram do modelo foram do ensaio A4 com R² de 0,75.

Analisando a figura 14, tem-se que, ao comparar o gráfico na figura 14a com a 14b, onde a única diferença entre eles é a temperatura, a 14b, que estava na maior temperatura (30°C) apresentou uma maior produção de metano observado. O mesmo comportamento acontece quando comparados os gráficos das figuras 14c e 14d entre si, onde a 14d, que também estava a 30°C, obteve uma maior produção de metano observada. A temperatura é um parâmetro importante para um bom funcionamento da digestão anaeróbia (ARAUJO, 2021). Ela tem influência sobre a velocidade de crescimento e, também, sobre o metabolismo dos microrganismos. Além disso, cada tipo de microrganismo atua em uma faixa diferente de temperatura. Os mesofílicos atuam em temperaturas próximas a 37°C, os psicofílicos em temperaturas mais amenas, próximas a 15°C e os termofílicos em temperaturas próximas a 60°C (SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2022). Dentro da classe das arqueas metanogênicas, as acetoclasticas apresentam uma maior sensibilidade a temperaturas elevadas e a literatura aponta que em estudos com temperaturas entre 20 e 35°C, a digestão anaeróbia apresenta valores de produção melhores nas temperaturas entre 30 e 35°C (SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2022; SOARES; FEIDEN; TAVARES, 2017). Sendo assim, pode-se entender que,

apesar de ambas as temperaturas estudadas estarem em uma faixa mais amena, os resultados obtidos para 30°C se destacam positivamente e corroboram com a literatura.

Ao comparar os gráficos da figura 14 em relação a presença ou não de agitação, nota-se que a maior produção de metano aconteceu no teste A2, onde o meio estava a 30°C e sem agitação. Comparando os testes de mesma temperatura, para 25°C (figuras 14a e 14c), o teste com agitação, apresentado na figura 14c (com agitação), se sobressaiu em produção de metano. Já para 30°C (figuras 14b e 14d), houve uma variação entre os dois testes e o que apresentou maior produção de metano foi sem agitação (figura 14d). A literatura reporta que a presença de agitação pode atuar positivamente na digestão anaeróbia, evitando as chamadas “zonas mortas”, onde pode ocorrer a sedimentação do lodo e a redução da capacidade útil do reator (BOHRZ, 2010). A aplicação da agitação favorece o contato entre o substrato e o lodo, além de favorecer a distribuição de nutrientes, microrganismos, substratos e até das enzimas no reator (SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2019). Sendo assim, espera-se que um sistema com agitação apresente resultados superiores a sistemas sem agitação.

Analisando o comportamento dos gráficos da figura 15, este é muito semelhante ao descrito anteriormente para os gráficos da figura 14 em relação aos mesmos parâmetros (agitação e temperatura), onde o teste que apresentou maior produção de metano foi, também, o que estava a 30°C sem agitação. Contudo, ao analisar a variação entre a produção de metano para o meio a 30°C com e sem agitação (figuras 15b e 15d respectivamente), não há uma variação expressiva da produção, diferente do visto para as figuras 14b e 14d, onde essa diferença é um pouco maior, ou seja, no meio com pH natural (6,60; figura 14) houve uma maior variação entre os resultados a 30°C com e sem agitação e no meio com pH 7,0 essa variação não é expressiva. Isso pode demonstrar um comportamento previsto na literatura, uma vez que as arqueas metanogênicas operam de forma mais eficaz em valores de pH mais próximos de 8 (DUPONT, 2021; KAMYAB; ZILOUEI, 2021).

Comparando de modo geral os gráficos das figuras 14 e 15, nota-se que, para os testes em meio com pH 7 (gráficos da figura 15), a produção de metano foi um pouco superior do que para os testes em meio com pH natural (gráficos da figura 14) – pH natural é 6,60. Isso pode ser justificado pela faixa de atuação ótima das arqueas metanogênicas. Segundo dados da literatura, as arqueas metanogênicas atuam entre os valores de pH 6,7 e 7,5 e em meios mais ácidos, com pH abaixo de 6,6, pode ocorrer a inibição do crescimento das arqueas metanogênicas, afetando diretamente a produção de biogás reator (DUPONT, 2021; KAMYAB; ZILOUEI, 2021; SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2022).

Observando a tabela 8, nota-se que os ensaios A1, A3, A4 e A5 apresentaram resultados

de máxima produção de metano (P) inferiores e próximos entre si, e os ensaios A2, A6, A7 e A8 resultados de P maiores e próximos entre si, sendo o maior deles o A2 com P de 31,46 mL. A literatura apresenta que para meios com as mesmas cargas fornecidas as produções de metano apresentam valores próximos (ALVES, 2018). Os valores de P obtidos para A1 e A5 foram inferiores aos dos demais testes e A2 e A6 superiores aos demais. Já os resultados de taxa máxima de produção de metano (R_m), com exceção de A1 e A2, foram próximos entre os demais testes, sendo o valor de A8 o melhor entre eles, de 29,69 mL/h. Analisando todos os ensaios, o A2 se destaca com a maior produção máxima de metano (P) de 31,46 mL, podendo indicar ser o ensaio com os parâmetros mais adequados para a metanogênese nesse estudo, com temperatura de 30°C, sem agitação e pH 6,60.

5.6.1 Análise de pH e DQO após AME

A fim de analisar a eficiência da digestão anaeróbia na redução da DQO do efluente estudado, foi realizada a análise conforme a metodologia descrita na seção 4.3.6.3 para a entrada e saída das amostras descritas na tabela 5 da seção 4.3.7.2, além do pH inicial e final. Assim, pode-se obter a tabela 9.

Tabela 9 - Dados obtidos de pH inicial, pH final, DQO inicial e DQO final para cada amostra de variação de parâmetros na AME e para o teste inicial.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
<i>pH inicial*</i>	6,60	6,60	6,60	6,60	7,00	7,00	7,00	7,00
<i>pH final*</i>	6,57	6,30	6,51	6,17	6,58	6,39	6,55	6,24
<i>Variação de pH</i>	↓ 1,30%	↓ 5,46%	↓ 2,30%	↓ 7,36%	↓ 6,00%	↓ 8,76%	↓ 6,43%	↓ 10,86%
<i>DQO inicial (mg/L)</i>	1718,33 ± 137,69	1718,33 ± 137,69	1718,33 ± 137,69	1718,33 ± 137,69	2101,67 ± 62,92	2101,67 ± 62,92	2101,67 ± 62,92	2101,67 ± 62,92
<i>DQO final (mg/L)</i>	3651,39 ± 233,91	5086,72 ± 212,56	4116,67 ± 280,38	5380,56 ± 353,48	4127,08 ± 395,28	5575,00 ± 430,75	4332,81 ± 401,50	5422,22 ± 357,14
<i>Variação de DQO (%)</i>	↑ 112,50%	↑ 196,03%	↑ 139,57%	↑ 213,13%	↑ 96,37%	↑ 165,27%	↑ 106,16%	↑ 158,00%

Fonte: própria autora. *pH é adimensional.

Legenda: ↓ indica redução; ↑ indica aumento. A1: 25°C, sem agitação, pH 6,60; A2: 30°C, sem agitação, pH 6,60; A3: 25°C, agitação de 100rpm, pH 6,60; A4: 30°C, agitação de 100rpm, pH 6,60; A5: 25°C, sem agitação, pH 7,00; A6: 30°C, sem agitação, pH 7,00; A7: 25°C, agitação de 100rpm, pH 7,00; A8: 30°C, agitação de 100rpm, pH 7,00.

Inicialmente, analisando a tabela 9 pode-se notar que para todos os casos estudados houve uma redução no pH após o fim da AME. Isso pode ocasionar uma diminuição na produção de metano. As arqueas metanogênicas são altamente sensíveis ao pH e apresentam uma faixa ótima de atuação entre os valores de 6,7 e 7,5 para pH (DUPONT, 2021; KAMYAB; ZILOUEI, 2021). Durante a digestão anaeróbia, a produção de ácidos voláteis tende a diminuição do pH do meio, sendo essa redução combatida pela ação das arqueas metanogênicas, tornando o meio mais alcalino. Contudo, a diminuição do pH para um valor inferior a 6,6 proporciona a inibição do crescimento das arqueas metanogênicas (SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2022). Com isso, apesar das baixas variações de pH apresentadas na tabela 10, os ambientes podem ter se tornado desfavoráveis para as *arqueas*. Pode-se observar, também, que para os testes onde os valores finais de pH foram os menores, os valores finais de DQO foram maiores, podendo sugerir uma relação entre a diminuição do pH e o aumento da DQO final.

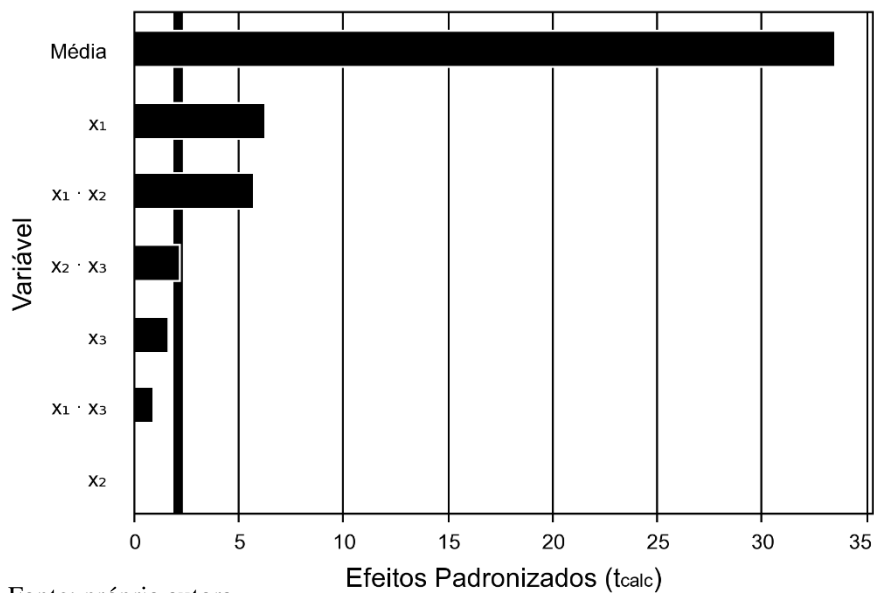
Ao analisar os dados de DQO inicial e final para cada situação da tabela 9 acima pode-se notar que em nenhum dos casos estudados houve uma remoção da DQO do meio, ao contrário, houve um aumento considerável, de 2 a 3 vezes, em relação a DQO inicial. Sendo assim, não é possível afirmar que os testes geraram um tratamento do efluente estudado, visto que sua carga orgânica aumentou. Além do pH, que foi citado acima como uma possível interferência nesse resultado, outro fator que pode influenciar negativamente ente a redução da carga orgânica é o excesso de nutrientes, que por sua vez podem proporcionar um direcionamento dos microrganismos para o crescimento, ocasionando um aumento na DQO. Braz (2019) analisou em seu trabalho o pré-tratamento enzimático do soro de queijo anterior ao tratamento biológico e, também, o tratamento simultâneo (biológico e enzimático). Com isso, ela concluiu que a redução da DQO do soro estudado foi relativamente baixa e isso poderia estar atrelado a presença das células íntegras, podendo contribuir com o aumento da carga orgânica. Sendo assim, pode-se supor com os resultados da tabela 9, que exista uma influência das células íntegras utilizadas como biocatalisador no aumento da carga orgânica, uma vez que existem nela os nutrientes provenientes do meio de cultura utilizado, com subproduto agroindustrial de alto valor nutritivo, além da presença do fungo utilizado no cultivo, que compõe a biomassa (BRAZ, 2019).

5.6.2 Análise estatística

Após realizados os ensaios de AME para o planejamento experimental proposto, foi possível analisar estatisticamente, conforme descrito na seção 4.3.7.2, os dados obtidos, a fim

de analisar a significância das variáveis envolvidas no processo, separadamente. Com isso, obteve-se a tabela 10 da matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com os fatores e os resultados para a variável resposta (volume de biogás, mL), o Gráfico de Pareto para análise de geração de volume de biogás na figura 16, a tabela 11 com o resumo da análise de variância ANOVA para a geração de volume de biogás e as figuras 17 e 18 com os gráficos de superfície resposta para as variáveis analisadas.

Figura 16 - Gráfico de Pareto com variáveis de regressão em ordem crescente de importância de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3



Analisando a figura 16, o Gráfico de Pareto demonstra que apenas a variável X_1 significância em um nível de confiança de 95% e a interação $X_1.X_2$. A interação $X_2.X_3$ mostrou uma significância ao observar a figura 16, contudo analisando o modelo matemático presente na tabela 11, é possível notar que sua influência é pequena quando comparada as demais variáveis significantes. Assim, foram descartadas as variáveis e interações que não apresentaram significância de acordo com o planejamento experimental, sendo elas X_2 , X_3 e $X_1.X_3$.

Tabela 10 - Matriz de planejamento fatorial completo 2³ com os fatores e os resultados obtidos para a variável resposta volume de biogás (mL).

ENSAIOS	AMOSTRAS	FATORES (VALORES REAIS)			VARIÁVEL RESPOSTA
		Temperatura (x ₁ , °C)	Agitação (x ₂ , rpm)	pH inicial (x ₃)	Volume de biogás (ml)
A1	A1 ¹	- 1 (25)	- 1 (0)	- 1 (6,60)	10,00
	A1 ²				18,00
	A1 ³				20,00
A2	A2 ¹	+ 1 (30)	- 1 (0)	- 1 (6,60)	28,00
	A2 ²				34,00
	A2 ³				38,00
A3	A3 ¹	- 1 (25)	+ 1 (100)	- 1 (6,60)	22,00
	A3 ²				23,00
	A3 ³				22,00
A4	A4 ¹	+ 1 (30)	+ 1 (100)	- 1 (6,60)	20,00
	A4 ²				22,00
	A4 ³				20,00
A5	A5 ¹	- 1 (25)	- 1 (0)	+ 1 (7,00)	14,00
	A5 ²				17,00
	A5 ³				15,00
A6	A6 ¹	+ 1 (30)	- 1 (0)	+ 1 (7,00)	32,00
	A6 ²				38,00
	A6 ³				28,00
A7	A7 ¹	- 1 (25)	+ 1 (100)	+ 1 (7,00)	25,00
	A7 ²				24,00
	A7 ³				27,00
A8	A8 ¹	+ 1 (30)	+ 1 (100)	+ 1 (7,00)	32,00
	A8 ²				30,00
	A8 ³				24,00

Fonte: própria autora.

Tabela 11 - Resumo da análise de variância (ANOVA) aplicada ao planejamento fatorial completo 2^3 para a variável resposta.

VARIÁVEL RESPOSTA	FONTE DE VARIACÃO	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	F _{cal}	F _{tab}	p-valor
Volume de Biogás (mL)	Regressão	960,5	3	320,2	24,8	3,1	0,000
	Resíduo	258,5	20	12,9	-	-	-
	Falta de ajuste	53,8	4	13,5	1,1	-	0,412
	Total	1219,0	23	-	-	-	-
R ²	78,79%						
Modelo matemático	$Y_1 = 24,29 + 4,54 x_1 - 4,12 x_1 x_2 + 1,54 x_2 x_3$						

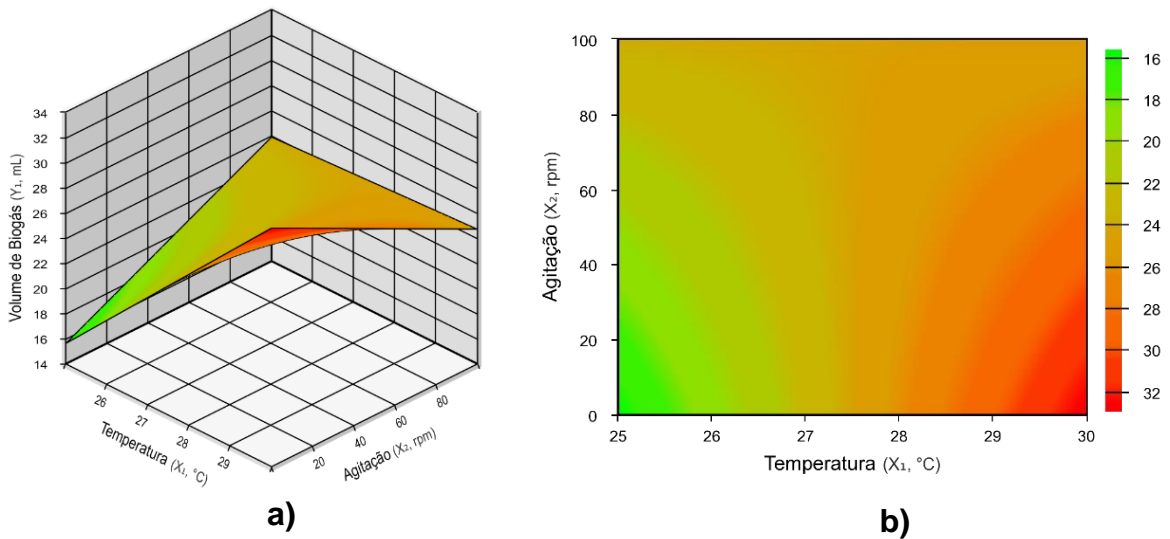
Fonte: própria autora.

Legenda: F_{cal} é o valor de F calculado; F_{tab} é o valor de F tabelado; Y₁ (mL) é o volume de biogás gerado; x₁ (°C) é a temperatura; x₂ (rpm) é a agitação; x₃ é o pH inicial.

Observando os dados apresentados na tabela 11, é possível notar que o modelo estudado explica 78,89% do processo e o F_{cal} foi cerca de 8 vezes superior ao F_{tab}. Além disso, observado o modelo matemático, nota-se que a variável X₁ (Temperatura, °C), tem uma influência significativa relativamente baixa nos resultados obtidos, assim como a interação entre as variáveis. Contudo, foi possível obter os gráficos de superfície resposta apresentados nas figuras 17 e 18.

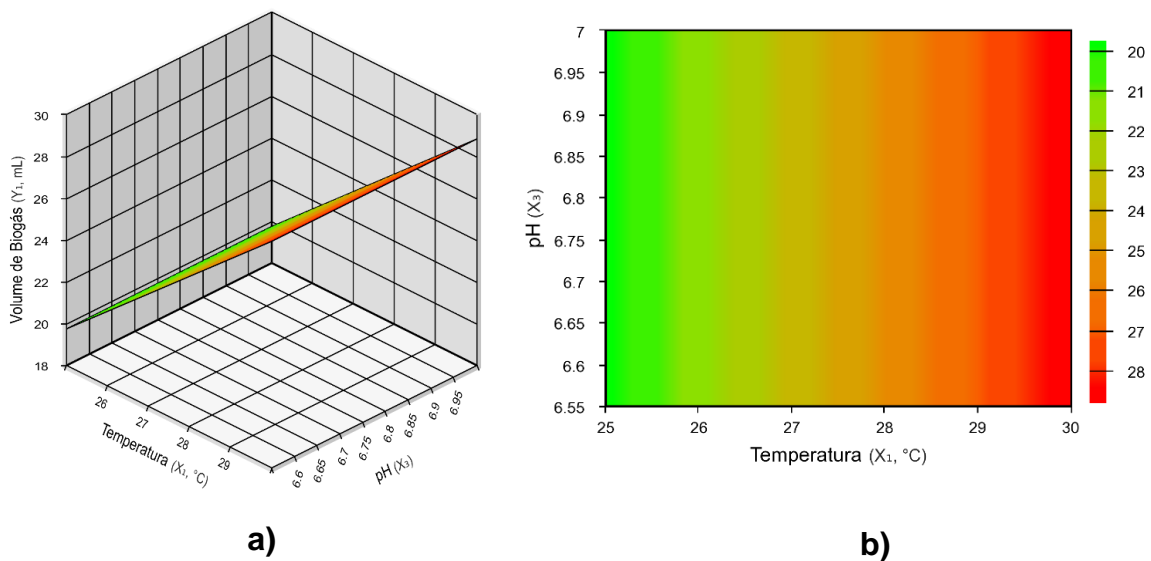
A figura 17 apresenta o gráfico de superfície resposta obtido pelo comportamento da geração de volume de biogás (Y₁, mL) em função da temperatura (X₁, °C) e da agitação (X₂, rpm) e a figura 18 o gráfico de superfície resposta obtido pelo comportamento da geração de volume de biogás (Y₁, mL) em função da temperatura (X₁, °C) e do pH (X₃), ambos dentro dos limites analisados.

Figura 17 - Superfície de resposta (a) e Mapa de contorno (b) para a geração de volume de biogás em função da temperatura e da agitação



Fonte: própria autora.

Figura 18 - Superfície de resposta (a) e Mapa de contorno (b) para a geração de volume de biogás em função da temperatura e do pH inicial



Fonte: própria autora.

Ao analisar a tabela 10, é possível notar maiores valores de volume de biogás gerado (variável resposta) nos ensaios realizados a 30°C quando comparado aos resultados dos ensaios a 25°C. Analisando a figura 18, é possível notar que a presença de agitação não apresenta grande influência na geração de volume de biogás, mas a temperatura sim, assim como na tabela 10. Em temperaturas mais próximas de 30°C houve uma maior geração de biogás quando comparada as temperaturas próximas de 25°C, mesmo com um intervalo pequeno de variação.

Na figura 18, pode-se notar que o pH não apresenta interferência nos resultados obtidos, já a temperatura se apresenta influente na geração de volume de biogás, com melhores valores em temperaturas próximas a 30°C. Esse resultado corrobora com a literatura e com os resultados obtidos na seção 5.6.1, onde a maior produção de biogás foi a 30°C e na literatura esse resultado pode ser explicado pela melhor atuação das arqueas metanogênicas em temperaturas próximas ou superiores a 30°C (DUPONT, 2021; KAMYAB; ZILOUEI, 2021).

Conforme reportado na literatura, em valores de pH entre 6,5 e 8,0, os microrganismos presentes na fase de metanogênese responsáveis pela geração de biogás atuam de forma mais eficaz (KAMYAB; ZILOUEI, 2021; SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES, 2022). Sendo assim, é possível entender que, devido a pequena variação de pH dos ensaios e por ambos os níveis estarem dentro desse intervalo mencionado na literatura, a variável pH não apresentou significância no planejamento experimental.

Assim, os parâmetros finais obtidos para a metanogênese, conforme os resultados da análise estatística, foram de 30°C, sem agitação no meio com pH 7,00.

6 CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento desse trabalho foi possível obter dados que possibilitam a destinação de subprodutos da indústria de alimentos, okará, bagaço de malte e soro de queijo para formulação do meio de cultura visando a produção de células íntegras com lipase ligada ao micélio, sendo uma alternativa viável que possibilita a redução dos seus impactos ambientais. Dentre os subprodutos estudados, o okará se destaca como aquele que possibilitou a obtenção de células íntegras com a maior atividade hidrolítica. Analisando os dois fungos filamentosos utilizados, o *Aspergillus oryzae* se destaca em relação ao *Penicillium citrinum*, sendo aquele que, combinado ao meio de cultura com okará, apresentou maior atividade hidrolítica $51,61 \pm 10,43$ U/g.

Pode-se concluir, também, que ao analisar o crescimento microbiano correlacionado à atividade hidrolítica do melhor meio de cultura (contendo okará) combinado ao melhor fungo (*Aspergillus oryzae*), tem-se o tempo ideal de cultivo de 96h, apresentando uma atividade de $50,22 \pm 4,13$ U/g e concentração de biomassa de $9,18 \pm 0,00$ g/L.

Com a determinação dos parâmetros bioquímicos das células íntegras produzidas, pode-se concluir que seu pH ideal de atuação é 8 e sua temperatura ideal é 45°C , com atividade hidrolítica de $50,60 \pm 0,77$ U/g nesses pontos. Quanto à estabilidade térmica, não foi possível determinar uma faixa de temperatura e tempo na qual as células íntegras resistem até total desnaturação, devido as diferentes variações ao longo do tempo para cada temperatura analisada, não havendo um decaimento constante da atividade até a desnaturação.

Foi possível concluir que as células íntegras produzidas apresentam uma boa resistência ao armazenamento, tanto sob refrigeração quanto sob congelamento, sofrendo reduções de cerca de 20 % em 2 meses de armazenamento, podendo, assim, serem armazenadas para uso posterior.

Ao caracterizar o efluente utilizado, pode-se concluir que este apresenta características próximas as retratadas na literatura, com pH de 6,60, DQO igual a $1430,00 \pm 99,22$ mg/L e concentração de Sólidos Totais, Sólidos Voláteis e Sólidos Fixos de $1073,33 \pm 29,69$ mg/L, $749,33 \pm 6,43$ mg/L e $324,00 \pm 36,06$ mg/L, respectivamente.

Com a realização do ensaio de AME aplicando as células íntegras simultaneamente ao processo de biodegradação anaeróbia, foi possível obter os maiores valores de geração de biogás nos ensaios A2 (condições: 30°C , sem agitação, pH 6,60) e A6 (condições: 30°C , sem agitação, pH 7,00), sendo o primeiro realizado a 30°C , sem agitação e pH inicial de 6,6, com volume médio gerado de $33,33 \pm 5,03$ mL e o segundo realizado a 30°C , sem agitação e pH

inicial de 7,0, com volume médio gerado de $32,67 \pm 5,03$ mL.

Além disso, pode-se concluir que, das variáveis estudadas, temperatura, agitação e pH inicial, a que apresentou maior relevância no bom funcionamento do processo foi a temperatura e isso foi comprovado pela análise estatística do planejamento fatorial completo 2^3 proposto.

Em nenhum dos casos de AME realizados conforme o planejamento experimental foi possível afirmar que houve um tratamento do efluente avícola estudado, uma vez que a DQO aumentou ao final dos experimentos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para o desenvolvimento de novos trabalhos sugere-se:

- reformular o meio de cultura em busca do maior rendimento de produção de células íntegras com elevada atividade hidrolítica;
- avaliar o potencial de produção de células íntegras utilizando subprodutos com outros fungos filamentosos;
- estudar potencial de aplicação de células íntegras provenientes de outros subprodutos e fungos filamentosos na geração de bioenergia;
- estudar as melhores condições para um maior rendimento na geração de biogás através da digestão anaeróbia com aplicação das células íntegras;
- Realizar o mesmo planejamento experimental aplicando um intervalo maior entre as variáveis, a fim de explorar a real influência de cada uma no processo.

REFERÊNCIAS

- ABRELPE - **Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais**. Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil 2021. São Paulo – SP, 2021.
- ALENCAR, V. N. S.; BATISTA, J. M. S.; NASCIMENTO, T. P.; DA CUNHA, M. N. C.; LEITE, A. C. L. Resíduos agroindustriais: uma alternativa promissora e sustentável na produção de enzimas por microrganismos. *In: CONGRESSO INTERNACIONAL DA AGROINDÚSTRIA*, 2020, [s. l.]. DOI <https://doi.org/10.31692/ICIAGRO.2020.0478>.
- ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 324–331, 2011.
- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 971, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>.
- ALVES, A. M. **Pré-tratamento enzimático de efluentes com elevado teor de gordura empregando células íntegras lipolíticas**. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2018.
- ALVES, Alex M.; MOURA, Rafael B. de; CARVALHO, Ana K. F.; CASTRO, Heizir F. de; ANDRADE, Grazielle S. S. Penicillium citrinum whole-cells catalyst for the treatment of lipid-rich wastewater. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 120, p. 433-438, jan. 2019. Elsevier BV.
- ANDRADE, G.S.S.; FREITAS, L.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 84, p. 183– 188, 2012.
- ANDRADE, G.S.S.; CARVALHO, A.K.F.; ROMERO, C.M.; OLIVEIRA, P.C.; DE CASTRO, H.F. Mucor circinelloides whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, [s. l.], v. 37, p. 2539–2548, 2014.
- APHA (1998). **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20th ed. Washington, 1998.
- APHA (2017). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater – SMEWW**. American Public Health Association – APHA, 23rd ed., Washington – USA, 2017.
- ARAÚJO, T. M. S. **Codigestão anaeróbia do lodo fresco do flotador e efluente bruto de um abatedouro de aves e potencial da produção de biogás**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel-PR, 2021.
- ARAYA, K.; UGARTE, A.; AZÓCAR, L.; VALERIO, O.; WICK, L. Y.; CIUDAD, G. Whole cell three phase bioreactors allow for effective production of fatty acid alkyl esters derived from microalgae lipids. **Fuel**, [s. l.], v. 144, p. 25–32, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA. **Relatório anual - 2022**. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/01/abpa-relatorio-anual-2022.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2023.

AZIZ, N. I. H. A.; HANAFIAH, M. M. Life cycle analysis of biogas production from anaerobic digestion of palm oil mill effluent. **Renewable Energy**, v. 145, p. 847–857, 2020.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l], 101368, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101368>

BOHRZ, G. I. **Geração de metano em lagoa anaeróbia: um estudo de caso em abatedouro de bovinos**. 153 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Santa Maria, 2010.

BRAZ, C. A. **Aplicações biotecnológicas do soro de queijo: produção de células íntegras com atividade lipolítica e geração de biogás**. 2019. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

BRAZ, C. A.; CARVALHO, A. K. F.; BENTO, H. B. S.; REIS, C. E. R.; CASTRO, H. F. de. Production of Value-Added Microbial Metabolites: oleaginous fungus as a tool for valorization of dairy by-products. **Bioenergy Research**, [s. l], v. 13, n.3, p. 963- 973, 21 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

CARVALHO, A. K. F. **Avaliação do potencial do fungo filamentosso *Mucor circinelloides* como fonte de lipase e lipídios para a produção de biodiesel dentro do conceito de biorrefinaria**. 2015. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, University of São Paulo, Lorena, 2015. doi:10.11606/T.97.2016.tde-14092016-180537.

CASTRO, F. F. de. **Caracterização da lipase ligada ao micélio e da esterase secretada de *Aspergillus Westerdykiae***. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

CHINAGLIA, S.; CHIARELLI L. R.; MAGGI M.; RODOLFI M.; VALENTINI G.; PICCO A. M. Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, [s. l], v.78, p.245-254, 2014.

CHIMINI, A. C.; ABILIO, D. P.; SIQUEIRA, O. A. P. A.; ANDRADE, M. C. N. de; MARTINS, O. G. Resíduos da indústria cervejeira na produção de novos substratos para o cultivo do cogumelo *Ganoderma lucidum*. **ENERGIA NA AGRICULTURA**, [s. l], v. 35, n. 2, p. 265–275, 2020. DOI: 10.17224/EnergAgric.2020v35n2p265-275.

CONG, S.; TIAN, K.; ZHANG, X.; LU, F.; SINGH, S.; PRIOR, B.; WANG, Z. X. Synthesis of flavor esters by a novel lipase from *Aspergillus niger* in a soybean-solvent system. **3 Biotech**, [s. l], 9(6), p.244, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1778-5>

CÓRDOVA, O.; SANTIS, J.; RUIZ-FILLIPI, G.; ZUÑIGA, M. E.; FERMOSO, F. G.; CHAMY, R. Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l], v. 82, p. 2806–2813, 2018. <https://doi.org/10.1016>

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. de; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, [s. l.], v. 40, No. 1, p. 85-96, 2017. DOI <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160163>.

COSTA FILHO, D. V.; SILVA, A. J.; SILVA, P. A. P.; SOUSA, F. C. Aproveitamento de resíduos agroindustriais na elaboração de subprodutos. *In*: II CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER-PDVAGRO 2017. ISSN: 2526-7701. Oral. João Pessoa: Pernambuco, 2017, p. 1–8, 2017.

DE MORAIS, A. R. V. B.; COHIM, E. H. B. Análise energética na cadeia produtiva do frango de corte em Feira de Santana-BA. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais**, [s. l.], 10(2), 120–134, 2022.

DHEEMAN, D. S.; ANTONY-BABU, S.; FRÍAS, J. M.; HENEHANG, T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium sp.* DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 72, n. 3–4, p. 256–262, 2011.

DUARTE, L. M. **Extração de potássio a partir da rocha verdete empregando ácidos orgânicos e fungos**. 2019. 38 F. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. DOI <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.32>.

DUPONT, G. K. **Modelagem matemática da co-digestão anaeróbia de dejetos de suínos e bagaço de mandioca para produção de metano**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Tecnologias Sustentáveis) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Carro Largo-RS, 2021.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Anuário Leite: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro**. 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite>. Acesso em: 20 maio 2022.

EMBRAPA SOJA. **Soja em números: Safra 2020/21**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 25 abr. 2022.

ESCALANTE, H.; CASTRO, L.; AMAYA, M. P.; JAIMES, L.; JAIMES-ESTÉVEZ, J. Anaerobic digestion of cheese whey: Energetic and nutritional potential for the dairy sector in developing countries. **Waste Management**, [s. l.], v. 71, p. 711–718, 2018.

FARGHALI, M.; MAYUMI, M.; SYO, K.; SATOSHI, A.; SEIICHI, Y.; TAKASHIMA, S.; ONO, H.; AP, Y.; YAMASHIRO, T.; AHMED, M. M.; KOTB, S.; IWASAKI, M.; IHARA, I.; UMETSU, K. Potential of biogas production from manure of dairy cattle fed on natural soil supplement rich in iron under batch and semi-continuous anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 309, p. 123298, 2020.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renew Sust Energ Rev**, [s. l.], vol. 52, p.179-188, 2015.

FERRAZ, J. L. de A. A.; SOUZA, L. O.; SILVA, T. P.; FRANCO, M. Obtenção de Lipases

Microbianas: Uma Breve Revisão. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, [s. l.], vol. 20, n. 1, 2018. DOI: 10.5935/RECEN.2018.01.03.

FERREIRA, A.; KUHN, S. S.; CREMONEZ, P. A.; DIETER, J.; TELEKEN, J. G.; SAMPAIO, S. C.; KUHN, P. D. Brazilian poultry activity waste: Destinations and energetic potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v.81, n.2, p.3081- 3089, 2018.

FERREIRA, J. dos S.; OLIVEIRA, D. de; MALDONADO, R. R.; KAMIMURA, E. S.; FURIGO JUNIOR, A. Enzymatic pretreatment and anaerobic co-digestion as a new technology to high-methane production. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s. l.], v. 104, n. 10, p. 4235-4246, 21 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

FERREIRA, T. F.; SANTOS, P. A.; PAULA, A. V. de; CASTRO, H. F. de; ANDRADE, G. S. S. Biogas generation by hybrid treatment of dairy wastewater with lipolytic whole cell preparations and anaerobic sludge. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 169, p. 107965, 2021.

GANJU, S.; GOGATE, P. R. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 215, p. 84– 96, 2017.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, [s. l.], 14, pp.241-253, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>

GULDHE, A.; SINGH, P.; KUMARI, S.; RAWAT, I.; PERMAUL, K.; BUX, F. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 85, p. 1002–1010, 2016.

IGARASHI, G. S. **Biotransformação empregando lipases ligadas ao micélio**. 2018. 40 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020.

IUBMB – **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. School of Physical and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London, Mile End Road, London, E1 4NS, UK, 2022. Disponível em: <<https://iubmb.qmul.ac.uk/>>. Acesso em: 04 nov. 2022.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in biophysics and molecular biology**, [s. l.], 132, pp.23-34, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014>

KAINTHOLA, J.; KALAMDHAD, A. S.; GOUD, V. V. A review on enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by different enhancement techniques. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 84, p. 81–90, 2019.

KAMYAB, B.; ZILOUEI, H. Investigating the efficiency of biogas production using modelling anaerobic digestion of baker's yeast wastewater on two-stage mixed UASB reactor. **Fuel**, [s. l.], v. 285, p. 119198, 2021.

KYEONG, J. S.; YEOM, S. H. Preparation of immobilized whole cell biocatalyst and biodiesel production using a packed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 2189–2198, 2014.

LIBERATTI, A. S. **Tratamento de efluente de abatedouro avícola visando o reuso da água**. 2018. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2018.

LIEW, Y. X.; CHAN, Y. J.; MANICKAM, S.; CHONG, M. F.; CHONG, S.; TIONG, T. J.; LIM, J. W.; PAN, G. Enzymatic pretreatment to enhance anaerobic bioconversion of high strength wastewater to biogas: a review. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 713, n. 1, abr. 2020. Elsevier BV.

LIMA, A. C. P.; CAMMAROTA, M. C.; GUTARRA, M. L. E. Obtaining filamentous fungi and lipases from sewage treatment plant residue for fat degradation in anaerobic reactors. **Peerj**, [s. l.], v. 6, n. 1, 14 ago. 2018. PeerJ.

LIMA, L. G. R.; GONÇALVES, M. M. M.; COURI, S.; MELO, V. F.; SANT'ANA, G. C. F.; COSTA, A. C. A. D. Lipase Production by *Aspergillus niger* C by Submerged Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], p.62, 2019.
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180113>

LIMA, R. T. de. **Produção de células íntegras de *Penicillium citrinum* para aplicação na hidrólise do óleo de soja**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017

LIMA, R. T.; ALVES, A. M.; PAULA, A. V. de; CASTRO, H. F. de; ANDRADE, G. S. S. Mycelium-bound lipase from *Penicillium citrinum* as biocatalyst for the hydrolysis of vegetable oils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], ISSN 1878-8181, v. 22, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101410>.

LI, Y.; CHEN, Y.; WU, J. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. **Applied Energy**, [s. l.], v. 240, p. 120–137, 2019.

MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Anuário da Cerveja. Brasília – DF, 2021. Disponível em: < http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/wp-content/uploads/2021/04/anuariocerveja2.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2022.

MARCHETTI, R.; VASMARA, C.; BERTIN, L.; FIUME, F. Conversion of waste cooking oil into biogas: perspectives and limits. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 104, n. 7, p. 2833–2856, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10431-3.

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. ANUÁRIO DA CERVEJA NO BRASIL 2018: Crescimento e Inovação. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, [s. l.], n. 72, p. 6, 2019.

- MAROTTI, BRAZ DE SOUZA. **Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.
- MAROTTI, B. S.; CORTEZ, D. V.; GONÇALVES, D. B.; DE CASTRO, H. F. Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 427–435, 2017.
- MAROTTI, B. S.; GONÇALVES, D. B.; CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F. de. Caracterização das propriedades bioquímicas de lipases ligada ao micélio de diferentes espécies do gênero *Penicillium*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, [s. l.], 2016.
- MARZO, C.; DIAZ, A. B.; CARO, I.; BLANDINO, A. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. **Waste Management and Research**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 149–156, 2019.
- MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, [s. l.], 8, 2017.
- MEHTA, A.; GROVER, C.; GUPTA, R. Purification of lipase from *Aspergillus fumigatus* using Octyl Sepharose column chromatography and its characterization. **Journal of basic microbiology**, [s. l.], 58(10), pp. 857-866, 2018. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800129>
- MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E..Lipases: From Production to Applications. **Separation & Purification Reviews**, [s. l.], pp.1-16, 2019.
- MELO, H. T. **Uso de subprodutos na nutrição animal**. 2021. 32 p. TCC (Bacharelado em Zootecnia) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia - GO, 2021.
- MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F. Biodegradação de Águas Residuárias de Laticínios Previamente Tratadas por Lipases. **Brazilian journal of food technology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 143–149, 2006.
- MENDES, D. B. **Seleção de fungos filamentosos produtores de lipases com potencial de aplicação para a produção de biodiesel por catálise enzimática**. 2019. 133 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade) - Universidade Federal do Tocantins, Palmas - TO, 2019.
- MENEZES, J.M.C.; LEITE, V.D.; BARROS, A.J.M.; LOPES, W.S.; SOUSA, J.T de.; CAMPOS, A.R.C. Influence of temperature on the anaerobic stabilization of organic solid residues. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v.14, p. 500-508, 2015.
- MULITERNO, M. M; RODRIGUES, D.; LIMA, F. S. de; IDA, E. I.; KUROZAWA, L. M. Conversion/degradation of isoflavones and color alterations during the drying of okara. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], 75. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.031>.
- NASCIMENTO, A. K. C. L. do. **Seleção de lipase microbiana para aplicação em reações de hidrólise e de esterificação do óleo da amêndoa de inajá (*Maximiliana maripa* (Aubl.)**

Drude) visando produção de biodiesel. 2015. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

NESHAT, S. A.; MOHAMMADI, M.; NAJAFPOUR, G. D.; LAHIJANI, P. Anaerobic codigestion of animal manures and lignocellulosic residues as a potent approach for sustainable biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 79, p. 308–322, 2017.

PANESAR, P.S.; KAUR, R.; SINGLA, G.; SANGWAN, R.S. Bio-processing of agroindustrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Appl Food Biotechnol**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 208–227, 2016.

PARPINELLI, W. **Utilização de resíduo seco de cervejaria na alimentação de frangos de corte.** Dois Vizinhos: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

PASCALE, N. C.; CHASTINET, J. J.; BILA, D. M.; SANT`ANNA JR, G. L.; QUITÉRIO, S. L.; VENDRAMEL, S. M. R. Enzymatic hydrolysis of floatable fatty wastes from dairy and meat food-processing industries and further anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 79, n. 5, p. 985–992, 2019. DOI: 10.2166/wst.2018.508.

PAULA, G.T.; FARIAS, H. P. S. de; ALI, L. R. F. Y.; RIBEIRO, R. C.; PEREIRA, V. S.; PAIVA, E. S.; PEREIRA, M. C. P. C. Desenvolvimento de uma formulação do “tipo hambúrguer” de okara com shitake. **SEMIOSES: Inovação, Desenvolvimento e Sustentabilidade**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 36-46, jan/mar. 2019.

PEREIRA, D.M. **Avaliação da capacidade antioxidante e anti-inflamatório do isolado proteico de soja, do okara e seus hidrolisados.** 2017. 78f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

PINTO, U. M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. de M. Deterioração microbiana dos alimentos. **Microbiologia e higiene de alimentos: teoria e prática.** Tradução. Rio de Janeiro: Rubio, 2019.

PRAMANIK, S. K.; SUJA, F. B.; ZAIN, S. M.; PRAMANIK, B. K. The anaerobic digestion process of biogas production from food waste: Prospects and constraints. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 8, n. August, p. 100310, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100310>.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 110, p. 48–68, 2012.

RECH, K. P. M.; ZORZAN, V. **Aproveitamento de resíduos da indústria cervejeira na elaboração de cupcake.** 2017. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2017.

REIS, W. de S. M. **Produção e caracterização de células íntegras de *Rhizopus oryzae* CCT3759 para ser aplicado como biocatalisador na hidrólise de óleos vegetais.** 2021. 47 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de

Alfenas, Alfenas, MG, 2021.

REMONATTO, D.; MIOTTI, R. H.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; PAULA, A. V. de. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: a review. **Process Biochem**, [s. l.], 114 (2022) 1–20, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CÂMERA, D. F.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; BACKES, G. T. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão/Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, [s. l.], v. 7, n. 1, pág. 9232–9254, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n1-624.

RODRIGUES, L. H. **Análise de metabólitos secundários em culturas de *Pestalotiopsis* e *Aspergillus aculeatus***. 2006. 111 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, [s. l.], 2006.

SARMAH, N.; REVATHI, D.; SHEELU, G.; RANI, K. Y.; SRIDHAR, S.; MEHTAB, V.; SUMANA, C. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 5–28, 2018.

SATO, P. M.; SOUZA, F. H. M.; SANTOS, G. E.; ANDRADE, G. S. S. Influência das condições de cultivo na produção de lipase ligada ao micélio por células íntegras de *Aspergillus oryzae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2019.

SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES. Embrapa. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. 1. ed. Concordia, SC, 2019. 209 p.

SBERA: EMBRAPA SUÍNOS E AVES. Embrapa. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. 2. ed. Concordia, SC, 2022. 211 p.

SIDDIQUE, M. N. I.; WAHID, Z. A. Achievements and perspectives of anaerobic codigestion: A review. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 194, p. 359–371, 2018.

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

SOARES, C. M. T.; FEIDEN, A.; TAVARES, S. G. Fatores que influenciam o processo de digestão anaeróbia na produção de biogás. **Nativa**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 522-528, 2018. DOI: 10.31413/nativa.v5i7.5155.

SOLARTE, C.; YARA-VARÓN, E.; ERAS, J.; TORRES, M.; BALCELLS, M.; CANELA-GARAYOA, R. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 100, p. 78–83, 2014.

SOUZA, Ludimila. **Brasil gera 79 milhões de toneladas de resíduos sólidos por ano**. Agência Brasil - São Paulo, 8 nov. 2019. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2019-11/brasil-gera-79-milhoes-de-toneladas-de-residuos-solidos-por-ano#:~:text=No%20Brasil%2C%20em%202018%2C%20foram,pouco%20maior%20que%20a%20gera%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 10 abr. 2022.

TAVARES, T.; MALCATA, F. X. Whey and Whey Powders: Fermentation of Whey. **Encyclopedia of Food and Health**, [s. l.], p. 486–492, 2015.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 117, jan. 2020. Elsevier BV.

VARDANEGA, R.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; POLLONI, A.; RIGO, E.; NINOW, L. N.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M.A. Systematic study on extraction of lipase obtained by solid-state fermentation of soybean meal by a newly isolated strain of *Penicillium sp.* **Food Process Technology**, [s. l.], v.3, p.461-465, 2010.

XIAO, M.; MATHEW S.; OBBARD J. P. A newly isolated fungal strain used as wholecell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. **Global Change Biology Bioenergy**, [s. l.], v.2, p.45-51, 2010.

YOSHIDA, A.; HAMA, S.; TAMADANI, N.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improved performance of a packed-bed reactor for biodiesel production through whole-cell biocatalysis employing a high-lipase-expression system. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 63, 76-80, 2012.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D.-J. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 98, p. 108–119, 2016.

ZAVARISE, J. P.; PINOTTI, L. M. Advances in biochemical characterization of microbial lipases: a review. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e104942897, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i4.2897.

ZHOU, G., CHEN, G., YAN, B. Processo biocatalítico de duas etapas usando lipase e catalisadores de células inteiras para produção de biodiesel a partir de óleo de pinhão-mansão não refinado. **Biotecnologia. Lett.** [s. l.], 37, 1959-1963, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1883-4>.