

## II-384 - PRÉ-TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CURTUME POR BACTÉRIAS E ENZIMAS LIPOLÍTICAS

**Vívian de Oliveira Lima<sup>(1)</sup>**

Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista, UNESP campus de São José do Rio Preto, com MBA em Perícia e Auditoria Ambiental pelo instituto IBPEX-UNINTER e mestranda no Programa de Mestrado em Engenharia Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR - Câmpus Londrina.

**Lílian Rodrigues de Lima Costa**

Aluna de graduação em Engenharia Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Londrina

**Kátia Valéria Marques Cardoso Prates**

Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos. Mestrado em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Professora da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Londrina

**Ajadir Fazolo**

Engenheiro Sanitarista pela Universidade Federal de Santa Catarina. Mestrado e Doutorado em Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Professor da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Londrina

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Jockey Club, 280, Bloco F, apto 23 – Vila Hípica - Londrina - Paraná - CEP: 86067-000 - Brasil - Tel: +55 (43) 9650-7308 - e-mail: [vlimabio@hotmail.com](mailto:vlimabio@hotmail.com).

### RESUMO

As águas residuárias industriais possuem propriedades físico-químicas distintas, sendo necessários estudos específicos para a escolha do tratamento de cada efluente, e assim, garantir maior eficiência e atendimento aos requisitos ambientais. Indústrias de alimentos, abatedouros, combustíveis, curtumes, entre outras, potencialmente, geram efluentes com elevado teor de óleos e gorduras (O&G). Tais compostos podem causar problemas operacionais e interferir no desempenho dos sistemas biológicos de tratamento. Por esse motivo, a remoção preliminar de O&G, em geral, é recomendada. Tratamentos físico-químicos são frequentemente empregados, porém, o custo e a geração de lodo químico devem ser considerados. A hidrólise enzimática de lipídios, tem se mostrado promissora no pré-tratamento de águas residuárias. O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias lipolíticas do efluente da graxaria de curtume, aplicação das mesmas no pré-tratamento deste efluente em escala laboratorial e comparar seus efeitos com o uso do produto comercial Enzilimp® e com enzima de pâncreas de porco (Sigma Aldrich®). Foram isoladas, do efluente de graxaria 14 cepas produtoras de lipase. A cepa MOV7 (estafilococo positivo), que apresentou maior índice enzimático, foi utilizada nos ensaios. A partir dos ensaios pode-se concluir que a diluição do efluente contribui para redução dos ácidos, de O&G e da DQO quando inoculado com micro-organismos, especialmente MOV7. Isso pode ser indicativo do efeito inibidor da elevada concentração de lipídios nos processos metabólicos das bactérias. A aeração do efluente diluído nas últimas 24 horas favoreceu a redução de DQO e O&G apenas para os ensaios com Enzilimp® e enzima. A não adaptação de MOV7 e outros micro-organismos ao metabolismo aeróbio podem ter prejudicado a eficiência do sistema. A adição de micronutrientes parece contribuir para o acúmulo de ácidos no sistema e a aplicação de enzima gera maior IA uma vez que a hidrólise parece ser maior que o consumo dos ácidos, contrariamente ao que ocorre nos ensaios inoculados com micro-organismos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lipase, Pré-tratamento, Curtume, Efluente lipídico

### INTRODUÇÃO

O lançamento de óleos e gorduras em corpos d'água pode provocar danos ao ecossistema aquático. Além do aumento da demanda de oxigênio, pode favorecer a formação de filme na superfície aquática, restringindo a difusão do oxigênio do ar para a água, acarretando na redução dos níveis de oxigênio dissolvido (OD) e possível morte de peixes e outros organismos aeróbios (Mongkolthanaruk & Dharmsthiti, 2002; Mendes &

Castro, 2005). A fim de reduzir tais riscos e manter o padrão de qualidade das águas, as Resoluções CONAMA no 357/2005 e CONAMA no 430/2011 estabelecem valor máximo permitido de lançamento de óleos vegetais e gorduras animais de 50 mgL<sup>-1</sup>, desde que rios classe 2 apresentem ausência virtual de óleos e gorduras.

Laticínios, abatedouros, curtumes, refinarias, produtoras de óleos vegetais (soja, girassol, oliva, etc.), biodiesel, entre outros, são indústrias geradoras de efluente com elevadas concentrações de óleos e gorduras (Masse et al., 2001; El-Bestawy et al., 2005; Alberton et al., 2010; Ramani et al., 2010; Basheer et al., 2011; Prasad & Manjunath, 2011; Rocha et al., 2013).

Os curtumes, que têm se destacado devido ao seu crescimento produtivo e econômico, gera em uma de suas etapas industriais cerca de 22 m<sup>3</sup> de efluente líquido por tonelada de couro processado, o que representa 70% do total gerado no processo produtivo. Nesta etapa, nomeada de ribeira, ocorre a eliminação de impurezas aderidas, como gordura, músculo e pelos, realiza-se recortes das extremidades das peles e prepara-se a matriz de fibras colágenas para reagir com os produtos químicos das etapas seguintes. Essas águas apresentam características como alcalinidade, cor esbranquiçada devido ao excesso de cal, presença de pelos, tecido muscular, sangue e um elevado teor de gordura animal (entre 5 a 8 kg de óleos e graxas para cada tonelada de pele processada) (CETESB, 2005).

Tais efluentes quando lançados em sistemas de tratamento biológico convencionais podem provocar a desestabilização e a redução da eficiência, uma vez que favorece a formação de lodo com baixa atividade, devido à adsorção da gordura ao floco, e aumento da resistência à transferência de massa. Também podem provocar a formação de lodo com tendência à flotação, devido ao acúmulo de gases (Rinzema, 1993; Hwu et al., 1998; Chao, 1981 apud Chipasa e Medrzycka, 2006; Jeganathan et al., 2007). Além disso, estudos demonstram que, em geral, os lipídios são mais lentamente degradados pelos micro-organismos, em comparação às outras moléculas orgânicas, aumentando o tempo de detenção hidráulica do sistema (Chipasa e Medrzycka, 2006). Dessa forma, o pré-tratamento desses efluentes segregados, para a degradação dos compostos lipídicos antes de serem encaminhados ao tratamento biológico convencional, pode ser uma alternativa a ser considerada.

Métodos físico-químicos, como a desestabilização por produtos químicos e a flotação com ar dissolvido, são os pré-tratamentos mais empregados. Entretanto, apesar de auxiliar na remoção lipídica, apresentam custo operacional elevado e geram lodo químico que necessita de destinação adequada (Mendes et al., 2005; Cammarota e Freire, 2006). Já o uso de enzimas, ao contrário dos produtos químicos, possibilita aumentar a eficiência de diversos processos industriais com mínimos riscos ambientais. Isso ocorre devido à especificidade das enzimas com seu substrato e por não gerarem subprodutos tóxicos (Mendes et al., 2005). Sob esse ponto de vista, tem se mostrado interessante o uso de lipases no pré-tratamento de efluentes lipídicos.

As lipases são enzimas que atuam na interface orgânico aquosa e promovem a hidrólise dos triacilgliceróis, atacando as ligações éster carboxílicas, liberando ácidos graxos e glicerol, que são moléculas mais facilmente degradáveis pelos micro-organismos (Mendes et al., 2006; Sirisha et al., 2010). Dentre as lipases utilizadas comercialmente, as de origem microbiana (bacteriana e fúngica) apresentam maior viabilidade comparada às de origem vegetal e animal. Isso devido à diversidade metabólica dos micro-organismos, a variedade de cepas produtoras existentes, a facilidade de manipulação gênica desses organismos, o rápido crescimento em meios de cultura de baixo custo, além da maior estabilidade da enzima (Wiseman, 1995 apud Hasan et al., 2006). As lipases bacterianas atuam em ambientes de pH neutro ou alcalino e sua maioria é termoestável, sendo por esses motivos mais usadas que aquelas de origem fúngica (Hasan et al., 2006). O crescimento das bactérias e fungos e consequentemente a produção de lipase são influenciados por fatores físico-químicos do meio, como pH, fonte de nitrogênio e carbono, temperatura e agitação. A maioria das bactérias lipolíticas tem seu ponto de crescimento e produção de lipase ótimos em pH neutro ou alcalino, e temperaturas entre 20 e 45 °C. Fontes orgânicas de nitrogênio favorecem o crescimento dessas bactérias e a presença de agentes emulsificantes, como goma arábica, Tween 80 e NaCl, podem aumentar a eficiência da enzima na hidrólise de lipídios. A produção e liberação da lipase para o meio extracelular é dependente de indutores presentes no meio, como por exemplo, triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, tweens e glicerol (Gupta et al., 2004; El-Bestawy et al., 2005; Mendes e Castro, 2005; Sirisha et al., 2010).

Muito se conhece sobre a atuação de lipases na remoção de óleos e gorduras em águas residuárias, entretanto poucos são os trabalhos que avaliam o uso de bactérias lipolíticas no tratamento de efluentes de curtume. Devido aos diferentes processos industriais e à diversidade das características físico-químicas das águas

residuárias, faz-se necessário avaliar os métodos de remoção de gordura existentes de modo específico, avaliando os efluentes individualmente, e assim reduzir sua carga orgânica, reduzindo seu efeito poluidor uma vez que seja lançado no meio ambiente. Assim esse trabalho se propôs a avaliar a potencialidade de obtenção de bactérias lipolíticas do efluente de curtume e aplica-las em sistema de pré-tratamento e comparar a eficiência das bactérias estudadas à eficiência do produto comercial Enzilimp® e da enzima de pâncreas de porco (Sigma Aldrich) no mesmo sistema.

## MATERIAL E METODOS

A água residuária utilizada neste estudo foi obtida da caixa de separação de gordura de curtume. As amostras do efluente foram armazenadas em recipientes plásticos estéreis e mantidas em laboratório sob refrigeração a 4 °C. A caracterização do efluente foi realizada analisando parâmetros de pH, condutividade, teor de óleos e gorduras (O&G), nitrogênio total (NTK), nitrogênio amoniacal, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos fixos (SF) e sólidos voláteis (SV), (AWWA/APHA/WEF, 2005).

Para obtenção dos isolados bacterianos, foi realizada diluição em série da amostra de efluente em solução salina 0,8%. Das diluições 10-1, 10-3 e 10-5 foram retiradas alíquotas de 100 µL e inoculados por espalhamento em dois meios de cultura sólido, um contendo óleo vegetal (óleo de soja) (MOV) e outro contendo gordura animal (MGA) (Tabela 1). As placas foram armazenadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, os micro-organismos foram esgotados em novas placas mantidas sob as mesmas condições de incubação descritas anteriormente para isolamento das colônias. A obtenção de organismos isolados foi confirmada após coloração de Gram.

As bactérias isoladas foram cultivadas em 3 mL de BHI mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida, alíquotas de 50 µL de BHI foram inoculadas sem espalhamento no centro de placas de cultura contendo Ágar Tween 20 (Tabela 1) e armazenadas em estufa a 37°C por 72 horas. Observou-se a formação de halos esbranquiçados ao redor das colônias, indicando quais isolados produziam lipase. O índice enzimático (IE) desses isolados foi obtido dividindo o diâmetro do halo de degradação pelo diâmetro do halo de crescimento. Os mesmos isolados foram submetidos à testes bioquímicos (catalase, TSI e MIL) para sua caracterização.

**Tabela 1: Especificação dos reagentes utilizados para cada meio de cultura.**

Meio de Cultura	Reagentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
MOV e MGA	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
	Extrato de Levedura	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2
	Óleo Soja / Gordura Animal	1
	Ágar	18
Ágar Tween 20	Peptona	10
	NaCl	5
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,1
	Tween 20	1% (v/v)
	Ágar	18

Para a preparação do inóculo utilizado nos ensaios de pré-tratamento, as bactérias lipolíticas com maior IE foram novamente cultivadas em BHI a 37°C e, após 24 horas, extraiu-se 100 µL inoculando-as em erlenmeyer contendo 50 mL de solução nutritiva de óleo vegetal. Os reagentes presentes nessa solução são os mesmos usados no meio MOV, porém sem adição de ágar. Os erlenmeyers foram mantidos em agitador incubador a 150 rpm, 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, inoculou-se 1% (v/v) da solução nutritiva em erlenmeyer contendo 50 mL de efluente estéril, sendo mantidos sob as mesmas condições de temperatura e agitação por 12 horas. Posteriormente, inoculou-se 1% (v/v) do pré-inóculo em erlenmeyer contendo 100 mL de efluente estéril, nas mesmas condições de incubação descritas anteriormente.

Com o inóculo pronto, foram realizados dois ensaios exploratórios de pré-tratamento do efluente de curtume como demonstrados na Tabela 2. O efluente submetido aos ensaios teve seu pH corrigido para 8 utilizando solução de NaOH 0,2 M e mantidos a temperatura de 30°C. O ensaio 1 foi conduzido em erlenmeyer de 250

mL, mantidos em agitador incubador SHAKER SL 222, com rotação de 150 rpm por 72 horas. O ensaio 2 foi preparado em tubos de vidro de 375 mL mantido em agitador incubador sob as mesmas condições anteriores por 48 horas. Após esse período os tubos foram transferidos para banho maria e aerados por 24 horas. O efluente de curtume utilizados nos ensaios não foi autoclavado.

Nos ensaios foram analisadas as seguintes variáveis respostas: índice de acidez (IA) (Instituto Adolfo Lutz, 2008), teor de óleos e gorduras (O&G) (Suehara et al., 2005) e DQO (AWWA/APHA/WEF, 2005). A variação em porcentagem das variáveis analisadas foi obtida segundo as equações 1 e 2.

**Tabela 2: Resumo das variáveis estudadas nos dois ensaios preliminares desenvolvidos. \*Cepa bacteriana obtida do efluente de curtume com maior índice enzimático. \*\*Solução nutritiva utilizada na obtenção do inóculo.**

Ensaio	Inóculo	Concentração do Inóculo	Água residuária	Objetivo	Tempo de ensaio (h)	Frequência amostragem
1	MOV7*	5% (v/v)	<i>In natura</i>	Concentração do inóculo	72	24 h
	Enzilimp	1% (p/v)				
	Enzima	1% (p/v)				
2	MOV7*	5% (v/v)	Diluída (1:10)	Concentração da água residuária	48 + 24 com aeração	0 h
	Enzilimp	1% (p/v)				
	Enzima	1% (p/v)		Adição de micronutrientes	24 com aeração	48 h
	MOV7*	5% (v/v) + 1mL solução nutritiva**				
	Enzilimp					72 h

$$V_{\%fermentativo} = \left[ \frac{(Vm_{0h} - Vm_{48h})}{Vm_{0h}} \right] \cdot 100 \quad \text{equação (1)}$$

$$V_{\%aerado} = \left[ \frac{(Vm_{48h} - Vm_{72h})}{Vm_{48h}} \right] \cdot 100 \quad \text{equação (2)}$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da água residuária (Tabela 3) revela que seu teor de gordura é muito elevado quando comparado com as concentrações de O&G dos efluentes lipídicos presentes na literatura (Cammarota e Freire, 2006). O pH apresenta-se levemente ácido, há grande concentração de sal, medida pela condutividade, equivalendo a 3,3g de NaCl.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 3: Caracterização físico-química da água residuária de curtume**

pH	Condutividade (mS.cm <sup>-1</sup> )	O&G (g.L <sup>-1</sup> )	NTK (gN.L <sup>-1</sup> )	N amoniacal (gN.L <sup>-1</sup> )	DQO (gO <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	ST (g.L <sup>-1</sup> )	SF (g.L <sup>-1</sup> )	SV (g.L <sup>-1</sup> )
6,31	6,10	17,14	1,81	0,56	44-50	27,34	1,70	25,64

Deste efluente foram obtidos 14 isolados lipase positivos com três morfologias distintas: estafilococo Gram positivo, bacilo Gram negativo e estreptobacilo Gram positivo. As bactérias estafilococos Gram positivo apresentaram os maiores IEs, destacando-se o isolado MOV 7, com IE igual a 0,35. Este apresentou resultados negativos para catalase e motilidade e capacidade de degradar apenas glicose.

Após a realização dos dois ensaios de pré-tratamento, comparou-se os resultados obtidos nas primeiras 48 horas. A figura 1 demonstra a inoculação com enzima promove maior liberação de ácidos quando comparado aos inóculos microbianos, e que essa acidez aumenta de 29% para 74% quando o efluente está diluído. Já nos tratamentos com micro-organismos, a acidez no efluente reduz após 48 horas tanto no efluente diluído quanto no efluente concentrado. O uso de Enzilimp apresentou redução de acidez de 30 e 23% em efluente in natura e diluído, respectivamente. Já o uso de MOV 7 apresentou redução de acidez de 28 e 43% em efluente in natura

e efluente diluído, respectivamente. Esse resultado pode indicar consumo dos produtos intermediários da hidrólise pelas bactérias. Trabalhos como os de Valente et al. (2010) e Alexandre et al. (2011) reportam baixa geração de ácidos graxos livres no processo de hidrólise, uma vez que sua geração é acompanhada de consumo pelos micro-organismos presentes no meio. A adição de micronutrientes influenciou na liberação e/ou o acúmulo de ácidos no sistema, com aumento médio do IA em 48%. A aeração fornecida nas últimas 24 no segundo ensaio, juntamente com o efluente diluído, favoreceu o aumento da acidez do efluente em todos os tratamentos, com exceção daqueles que continham micro-organismos enriquecidos com micronutrientes.

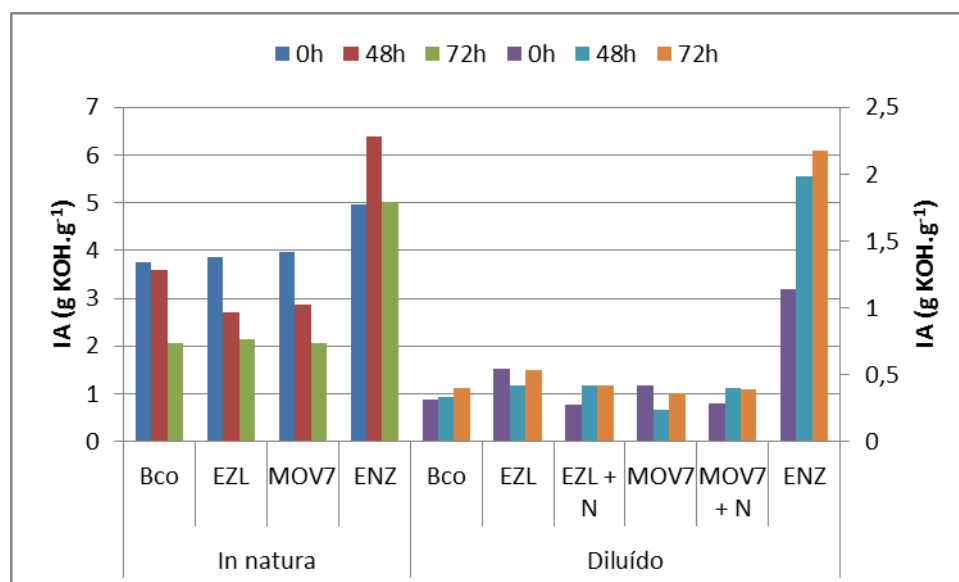


Figura 1: Índice de Acidez medido nos ensaios preliminares 1 e 2 com efluente *in natura* e diluído, respectivamente

A variação do teor de O&G nas primeiras 48 horas, demonstrada na figura 2, foi maior nos ensaios inoculados com micro-organismos em efluente diluído, com destaque para a cepa MOV7 que aumentou sua eficiência em 95%. O melhor resultado no efluente diluído pode ser atribuído à quantidade excessiva de gordura no efluente do curtume, que pode ser fator limitante na eficiência de remoção lipídica. O trabalho de Jung e colaboradores (2002) demonstrou uma redução da eficiência do tratamento biológico do efluente conforme aumentava sua concentração lipídica, apresentando eficiência de remoção de DQO igual a 0% quando a concentração de óleos e gorduras se encontrava igual ou superior a 800 mg.L<sup>-1</sup>. Além disso, sabe-se que a ativação da lipase depende da formação de uma interface lipídeo/água e da adsorção da enzima nessa interface. Com isso o trabalho de Rooney e Weatherley apud Mendes et al. (2005) revelaram que quanto menor a razão óleo/água maior será a extensão da hidrólise. Porém, a diluição nas primeiras 48 horas não trouxe benefício à redução do teor de O&G quando inoculado com enzima. É possível que a concentração de enzima de 1% já seja suficiente para solubilizar a matéria orgânica, mesmo no efluente concentrado. A adição de micronutrientes não apresentou efeito conclusivo na variação do teor de O&G.



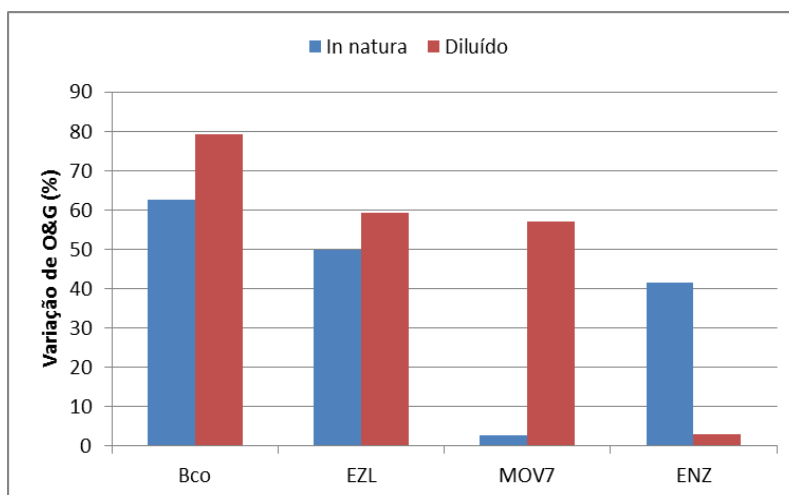


Figura 2: Variação do teor de O&G nas primeiras 48 horas dos ensaios preliminares 1 e 2

A aeração do sistema no segundo ensaio melhorou a eficiência de remoção de O&G para os ensaios inoculados com Enzilimp® e com enzima (Figura 3). Uma possível explicação para a eficiência reduzida do inóculo MOV7 no período aerado é que tais micro-organismos não estariam adaptados ao metabolismo aeróbio. Estudos realizados por Fadile et al. (2011) indicam que a inoculação de biomassa adaptada elevou a remoção de DQO, de 84,28% contra 51,88% para micro-organismos sem adaptação, após 6 dias de ensaio.

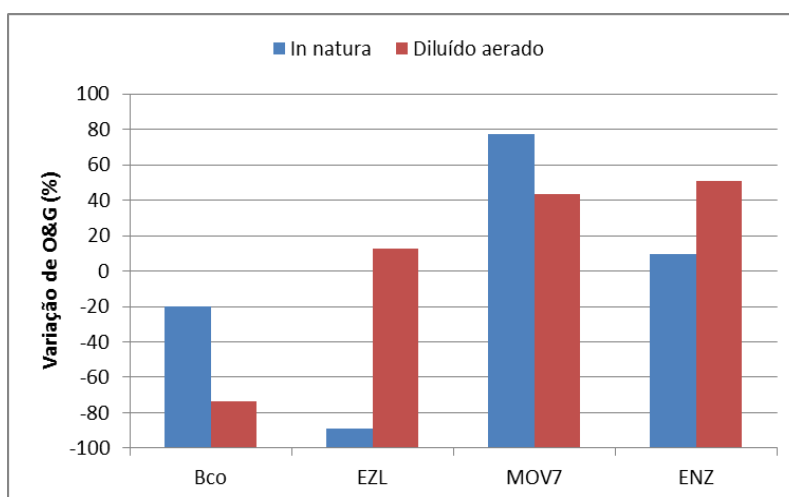


Figura 3: Variação do teor de O&G (%) nas últimas 24 horas dos ensaios preliminares 1 e 2

A redução de DQO também foi maior nos tratamentos aplicados ao efluente diluído, destacando-se o tratamento com o isolado MOV 7 (5%) que apresentou maior eficiência de redução (44%), visto na figura 4. Isso sugere que a segregação do efluente para seu pré-tratamento pode não ser eficaz, e o excesso de gordura ou outros elementos químicos podem atuar como inibidores da ação microbiana em degradar tais compostos orgânicos. A utilização de micronutrientes parece atuar negativamente na redução da DQOt do sistema. A aeração favoreceu a redução da DQO nos ensaios com Enzilimp® e com enzima. Aparentemente, após a hidrólise dos lipídios nas primeiras 48 horas, as bactérias aeróbias presentes no efluente são favorecidas com a aeração aumentando o consumo da matéria orgânica, e, assim, melhorando a eficiência do tratamento. O uso de sistemas de lodo ativado em pós-tratamento de efluentes com elevado teor de lipídios tem apresentado bons resultados, com eficiência de remoção de DQO entre 60 e 75% para concentrações de 13 g.L-1 de O&G (Liu et al., 2004).

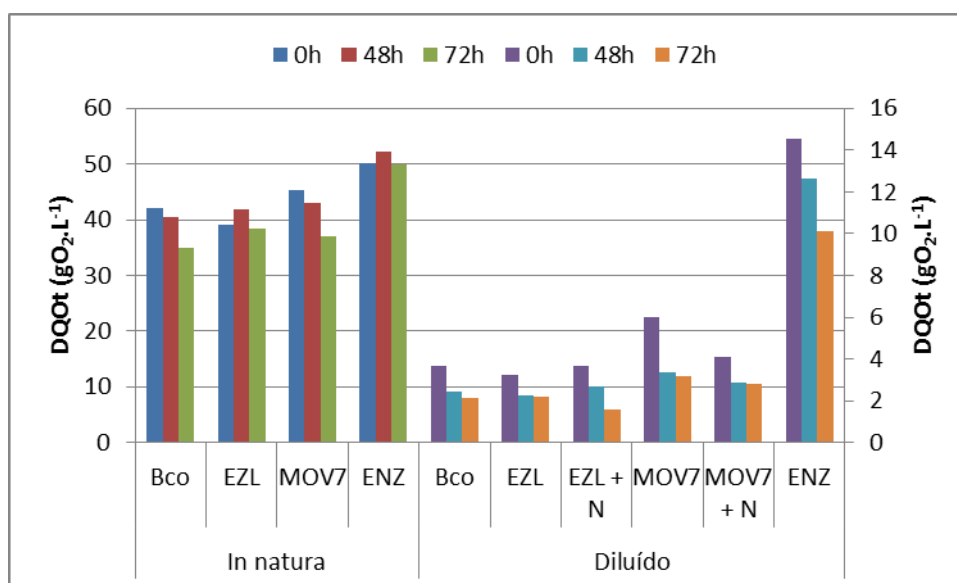


Figura 4: DQO total medida nos ensaios preliminares 1 e 2

O fato de o branco ter apresentado resultados semelhante aos ensaios testados, confirma a presença natural de micro-organismos lipolíticos no efluente. A associação dos diferentes organismos produtores de lipase no efluente bruto podem gerar efeitos semelhantes ao efluente enriquecido com apenas uma das espécies. Trabalhos como os de El-Bestawy et al. (2005) demonstram que a associação de mais de uma espécie bacteriana no tratamento de efluente lipídico garante maior eficiência de remoção da DQO comparado ao efluente tratado com apenas uma espécie enriquecida.

## CONCLUSÃO

Efluentes com elevado teor de O&G são fontes de bactérias lipolíticas que podem ser aplicadas no pré-tratamento desses efluentes. O efluente gerado no curtume, a princípio apresenta maior eficiência na redução de O&G e DQO quando realizado um processo de diluição. Os ensaios não evidenciaram de modo significativo quais inóculos são mais eficazes no pré-tratamento, sendo necessários mais estudos para compreender melhor as variáveis que influenciam o sistema. O uso de aeração no pós-tratamento dessas águas residuárias também sugere maior eficiência, porém acredita-se ser necessário pré-adaptação da biomassa. É imprescindível análises complementares que objetivam a otimização, reduzindo custos e tempo de tratamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTON, D., MITCHELL, D. A., CORDOVA, J., ZAMORA, P. P., Krieger, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microspores* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. *Food Technol. Biotechnol.*, 48:(1) 28-35, 2010.
2. ALEXANDRE, V. M. F., VALENTE, A. M., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolyzed with a solid enzyme pool. *Renewable Energy*. 36:3439-3444, 2011.
3. APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation, 22 ed, Washington, 2005.
4. BASHEER, S. M., CHELLAPPAN, S., BEENA, P. S., SUKUMARAN, R. K., ELYAS, K. K., CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnology*, v.28, n.6, p. 627-638, 2011.
5. CAMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, p. 2195-2210, 2006.
6. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Curtumes. Série P+L. 21 ed. 76p. São Paulo, 2005.

7. CHIPASA, K. B., MEDRZYCKA, K. Behavior of lipids in biological wastewater treatment processes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, n.33, p. 635–645, 2006.
8. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº357 de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em: 01 ago. 2013.
9. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº430 de 13 de maio de 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama>. Acesso em: 01 ago. 2013.
10. EL-BESTAWY, E., EL-MASRY, M. H., EL-ADL, N. E. The potentiality of free Gram-negative bacteria for removing oil and grease from contaminated industrial effluents. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, n. 21, p. 815–822, 2005.
11. FADILE, A., EL HASSANI, F. Z., HALAH, A., MERZOUKI, M., BENLEMLIH, M. Aerobic treatment of lipid-rich wastewater by a bacterial consortium. ***African Journal of Microbiology Research***, 5, 5333–5342, 2011
12. GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, n. 64, p. 763 – 781, 2004.
13. HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, p. 235–251, 2006.
14. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4ª ed. 1ª edição digital, São Paulo, 2008.
15. JEGANATHAN, J., NAKHLA, G., BASSI, A. Oily wastewater treatment using a novel hybrid PBR–UASB system. *Chemosphere*, p. 1492–1501, 2007.
16. JUNG, F., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. Impact of enzymatic pré-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. *Biotechnol. Lett.* 24, 1797-1802, 2002.
17. LIU, V. L., NAKHLA, G., BASSI, A. Treatability and kinetics studies of mesophilic aerobic biodegradation of high oil and grease pet food wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 87-94, 2004.
18. MASSE, L., KENNEDY, K. J., CHOU, S. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technology*, n. 77, p. 145-155, 2001.
19. MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B., JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
20. MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B., JÚNIOR, A. F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
21. MENDES, A. A., PEREIRA, E. B., CASTRO, H. F. Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodegradation. *Biochemical Engineering Journal*, n. 32, p. 185-190, 2006.
22. MONGKOLTHANARUK, W., DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, p. 101–105, 2002.
23. PRASAD, M. P., MANJUNATH, K. Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian Journal of Biotechnology*, n. 10, p. 121-124, 2011.
24. RAMANI, K., CHOCKALINGAM, E., SEKARAN, G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 37, n. 5, p. 531-535, 2010.
25. RINZEMA, A. Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular Sludge Bed Reactors. *Process Biochemistry*, p. 527-537, 1993.
26. ROCHA, D., GOMES, B. M., GOMES, S. D., SENE, L., ZENATTI, D. C. Selection of microorganisms producer of lipase for fat removal from biodiesel purification water. *Eng. Agrí. Jaboticabal*, v. 33, n.2, p. 332-340, 2013.
27. SIRISHA, E., RAJASEKAR, N., NARASU, M. L. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biological Research*, v. 4, n. 5, p. 249-252, 2010.
28. SUEHARA, K. KAWAMOTO, Y., FUJII, E., KOHDA, J., NAKANO, Y., YANO, T. Título do artigo *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, n.4, p. 437-442, 2005.
29. VALENTE, A. M., ALEXANDRE, V. M., CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 30(2): 483-488, 2010.