



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
AMBIENTAIS

ROBERTA LEITE SANTOS REIS

**Avaliação da Eficiência de *Aspergillus parasiticus* UCP 1281
no Biotratamento de Resíduos da Indústria de Laticíneos**

Recife

2015

ROBERTA LEITE SANTOS REIS

**Avaliação da Eficiência de *Aspergillus parasiticus* UCP 1281
no Biotratamento de Resíduos da Indústria de Laticíneos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientador: **Prof^a. Dr^a. Kaoru Okada**

Co-orientador: **Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva**

**Recife
2015**

Avaliação da Eficiência de *Aspergillus parasiticus* UCP 1281 no Biotratamento de Resíduos da Indústria de Laticíneos

ROBERTA LEITE SANTOS REIS

Examinadores:

Prof.^a Dr.^a Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof.^a Dr.^a Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof.^a Dr.^a Galba Maria Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Defendida em: ___ / ___ / ___

Coordenadora: Prof.^a Dr.^a Clarissa Daisy Costa Albuquerque

Dedico ao meu marido Ivo Reis e a minha família, em especial à minha mãe Maria das Graças Cotrim Leite, que sempre vibraram com minhas conquistas, e acima de tudo sempre acreditaram no meu potencial.

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado...

Roberto Shinyashiki.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta etapa vencida em minha vida e de ter me abençoado com essa vitória;

À Professora Dr^a Kaoru Okada, pela orientação desse trabalho com a sua dedicação e disponibilidade de seu tempo, a você desejo todo o meu carinho e respeito;

Ao Professor Dr Carlos Alberto Alves da Silva, pela co-orientação e sua dedicação nesse trabalho;

Ao Professor. Dr. Re Pedro Rúbens Ferreira Oliveira, S.J. da Universidade Católica de Pernambuco, pela estrutura e alta qualidade dos laboratórios.

À professora Dr^a Galba Maria Campos Takaki por sua imensa atenção e colaboração em nossos trabalhos realizados no laboratório, aperfeiçoando nossos conhecimentos durante nossa caminhada;

Aos Professores do Programa do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais;

Às minhas amigas e colegas do núcleo de Pesquisa em ciências Ambientais, Grayce Kelli Barbosa, Nairane Rosa da Silva Leão, Adriana Ferreira de Souza e Vanessa Assis de Melo, que tanto me ajudaram no laboratório. Vocês são pessoas especiais que farão sempre parte de minha vida;

Aos colegas da nona turma do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais;

A todos os Colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, em especial Marcos Antônio Cavalcanti Luna , Eduardo da Silva França e Tiago Lira de Melo pela atenção e apoio;

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais;

Ao meu marido Ivo Aquino Lima Reis, por me fazer acreditar que posso ser sempre melhor;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| AGRADECIMENTOS | v |
| SUMÁRIO | vi |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS | ix |
| LISTA DE ABEVIAÇÕES | x |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xii |
| CAPÍTULO I | xiii |
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 17 |
| 2.2. Objetivos Específicos..... | 17 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 3.1 Efluentes Industriais..... | 18 |
| 3.1.2 Efluentes Lácteos..... | 19 |
| 3.2 Tratamento Convencional de Efluentes com Alto Teor de Lipídeos..... | 22 |
| 3.2.1 Tratamento Preliminar..... | 23 |
| 3.2.2. Tratamento Secundário..... | 23 |
| 3.2.3 Tratamento Terciário..... | 24 |
| 3.2.4 Biorremediação..... | 24 |
| 3.3 Enzimas..... | 25 |
| 3.3.1 Mecanismo de Ação das Enzimas..... | 26 |
| 3.3.2 Enzimas no Tratamento de Efluentes..... | 28 |
| 3.3.3 Lipase..... | 28 |
| 3.3.4 Propriedades da Lipase..... | 29 |
| 3.3.5 Aplicações da Lipase..... | 30 |
| 3.3.6 Aplicação da Lipase no tratamento de efluentes com alto teor de lipídeos..... | 31 |
| 3.3.7 Fontes de Lipases..... | 32 |
| 3.3.8 Micro-organismos produtores de Lipase..... | 32 |
| 3.4 Gênero <i>Aspergillus</i> | 35 |
| 3.4.1 <i>Aspergillus parasiticus</i> | 36 |
| REFERÊNCIAS | 38 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| CAPÍTULO II..... | 45 |
| CAPÍTULO III..... | 58 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 59 |
| ANEXO | 60 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação esquemática da transformação do substrato (sacarose) em produtos (glicose e frutose), realizada pela enzima (invertase)..... | 27 |
| Figura 2. Modelo do mecanismo de chave fechadura proposto por Emil Fisher | 27 |
| Figura 3. Classificação da lipase | 29 |
| Figura 4. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases..... | 30 |
| Figura 5. Morfologia representativa da espécie do gênero <i>Aspergillus</i> | 36 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Figura 1. Crescimento radial no meio de CYE verso (A) e reverso (B) da placa)..... | 51 |
| Figura 2. Crescimento radial de <i>Aspergillus</i> sp no meio de MEA verso (A) e reverso (B) da placa). | 51 |
| Figura 3. Micrografias da cultura no meio de CYE conidiosporos com conídios globosos e rugoso (A) e vesículas com poucas seriação bisseriada métulas e fiálides) (B) | 51 |
| Figura 4. Perfil de crescimento de <i>A. parasiticus</i> , em 120 horas de cultivo em meio padrão nas temperaturas 28 e 37 ° C..... | 51 |
| Figura 5. Perfil atividade lipolítica de <i>A. parasiticus</i> , em 120 horas de cultivo em meio padrão nas temperaturas 28 e 37 ° C..... | 52 |
| Figura 6. Curva de crescimento, determinação de lipase de lipídeos da amostra de <i>A. parasiticus</i> (SIS 16). | 52 |
| Figura 7. Diagrama de Pareto: A- Produção de lipase e B - Produção de lipídeos. | 53 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial para formulação de meios alternativos | 50 |
| Tabela 2. Planejamento fatorial 22 com os resultados de biomassa, tensão superficial, pH e atividade enzimática..... | 52 |

LISTA DE ABEVIAÇÕES

ABIQ Associação Brasileira das Indústrias de Queijo

ATP Adenosina Trifosfato

DBO Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO Demanda Química de Oxigênio

ES Enzima-Substrato

pH Potencial de Hidrogênio Iônico

RS Resíduo de Sorvete

SL Soro de Leite

UV Ultravioleta

RESUMO

Com o Avanço na área da biotecnologia, principalmente relacionadas à tecnologia das fermentações, almejam perspectivas para o biotratamento de resíduos. O termo resíduo é utilizado em sentido amplo, juntando não somente sólidos mais também os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas. Os efluentes industriais gerados em indústrias de laticínios que em geral possuem elevados teores de demanda bioquímica (DBO) e química de oxigênio (DQO), tendo em vista um elevado conteúdo de gorduras, aumentam a concentração de matéria orgânica, Justificando a necessidade de biotratamento. Neste sentido foram avaliados o potencial biotecnológico do fungo *Aspergillus parasiticus* isolado do solo da Caatinga, PE, Brasil, na produção de biomoléculas de enzima lipase e lípídeos, visando à aplicação no biotratamento de resíduos da indústria de laticíneos. A confirmação da produção da enzima por *A. parasiticus* foi realizada com o cultivo em meio padrão na presença do óleo de oliva 0,5 g/L durante 120 h, incubados a 28°C e 37°C, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram que a melhor condição foi obtida em 96 h de cultivo a 28°C com um índice de 5,2 U/ml. Em seguida foram realizados ensaios com resíduos ricos em óleos, o soro de leite (SL) e o resíduo de sorvete (RS), provenientes de rejeitos das indústrias lácteas, utilizando um planejamento fatorial 2², com três repetições no ponto central, durante 120 horas a 28°C. Observam-se que o ensaio 4, com 45% de (RS) e 30% (SL) demonstravam os melhores resultados na produção de biomassa 68,1 g/L e atividade lipolítica 20,0 U/mL, e um maior acúmulo de lípídeos em sua biomassa atingindo 67.61 %, sugerindo que o biotratamento é possível, além de outras aplicabilidades na biotecnologia em especial a produção de biodiesel, se tratando de um fungo oleaginoso.

Palavras-Chave: Enzimas, Lipase, *Aspergillus Parasiticus*, Rejeitos Agroindustriais.

ABSTRACT

With the advance in biotechnology, especially related to technology of fermentation, aumejam perspectivas for bioremediation of waste. The term waste is used in a broad sense, adding not only more solid also the wastewater and the materials present in air emissions. The waste water generated in general that dairy industries have high levels of biochemical demand (BOD) and chemical oxygen (COD) with a view to a high content of fats, increase the concentration of organic matter, justifying the need to bioprocessing. In this sense we assessed the biotechnological potential of the fungus *Aspergillus parasiticus* isolated from soil of the Caatinga, PE, Brazil, in the production of biomolecules lipase enzyme and lipid seeking their application in bioremediation of waste from laticíneos industry. Confirmation of enzyme production by *Aspergillus parasiticus* was performed by culturing in standard medium in the presence of olive oil 0.5 g / L for 120 h, incubated at 28 ° C and 37 ° C respectively. The results showed that the best condition was obtained in 96 hours of cultivation at 28 ° C with a Idice 5.2 U / ml. Then tests were carried out with waste rich in oils, serum leiten (SL) and the ice cream residue (RS) from the dairy industry waste, using a 22 factorial design with three replications at the center point, for 120 hours at 28 ° C. Observed that the test 4, with 45% (RS) and 30% (SL) showed the best results in the production of biomass 68.1 g / L and lipase activity 20.0 U / mL, and greater accumulation of lipids in their biomass reaching 67.61% in lipids, suggesting that the biotreatment is possible, in addition to other applicability in biotechnology in particular the production of biodiesel, in the case of an oleaginous fungus.

Keywords: enzymes, lipase, *Aspergillus parasiticus*, Waste agribusiness.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento tecnológico e crescimento econômico industrial, o consumo de bens e produtos vem aumentando proporcionalmente o poder aquisitivo da sociedade. A crescente demanda por produtos alimentícios pela população, e com isso uma maior quantidade de resíduos a são produzidos nos processos industriais, que são lançados nos cursos d'água (ARCHELA, 2010).

Gorduras e óleos são os principais resíduos gerados pelas indústrias de processamento de alimentos, indústrias de laticínios, indústrias de bebidas, etc e são liberados na água ou esgotos sem tratamento prévio, provocando a degradação do ambiente com consequência para a flora e fauna. As gorduras e os óleos são substâncias que são constituídos predominantemente misturas de ésteres de ácidos graxos do álcool ou tri-hidroxi de glicerol (NWOBI et al., 2006).

Portanto o impacto negativo de efluentes gordurosos e óleos podem ser minimizados pela utilização de enzimas hidrolíticas de origem microbianas. A pré-hidrolise enzimática de gorduras e óleos aumentam a eficiência da remoção, bem como aceleram o processo de degradação desses contaminantes ambientais, tornando possível uma transformação biotecnológica, superando o desenvolvimento dos processos químicos convencionais (YANG et al., 2009).

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases e que atuam sobre ligações éster. As lipases (E.C.3.1.1.3), pela definição clássica, são glicerol éster hidrolases e, de acordo com (JAEGER et al., 1994), atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol. As lipases são as enzimas mais utilizadas em síntese orgânica e mais de 20% das biotransformações são realizadas utilizando-as (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010).

Estas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em micro-organismos, tendo papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos: Como enzimas digestivas, a deposição e mobilização dos tecidos de reservas energéticas e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (VILLENEUVE et al., 2000). Ainda, dentre os microrganismos, os fungos filamentosos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente

são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo o *Aspergillus* um dos mais conhecidos produtores de lipases com muitas aplicações industriais (MAHADIK et al, 2002).

As lipases microbianas são consideradas versáteis, pois apresentam uma série de vantagens em relação às lipases produzidas por células animais e vegetais (SETH et al., 2014). Fungo filamentososo do gênero *Aspergillus* se destaca como excelente produtor de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental, com elevada taxa de crescimento e termotolerância, o que favorece estudos de seleção e produção de bioprodutos de alto valor agregado (LIMA, 2014).

Considerando a importância das investigações nos biotratamento esse trabalho Investigou o potencial biotecnológico de *Aspergillus Sp*, isolado da Caatiga de Pernambuco, visando à aplicação no biotratamento de efluentes oleaginosos provenientes das indústrias lácteas, além de avaliar a produção simultânea de lípase e lipídeos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial de *Aspergillus* *Sis* 16, isolado da Caatinga de Pernambuco, visando à aplicação no biotratamento de efluentes oriundos da indústria láctea, averiguando a produção simultânea de biomassa e lipase, como produtos de elevados interesses biotecnológicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar a espécie do *Aspergillus* Sp, utilizando a técnica de morfologia clássica;
- Estudar a influência do tempo e da temperatura na produção de biomassa e da atividade enzimática da lipase por *Aspergillus* Sp, em meio controle;
- Analisar a produção de biomassa, lipase e lipídeos totais utilizando diferentes concentrações dos efluentes lácteos, (soro de leite e resíduo de sorvete), aplicando um planejamento fatorial completo 2²;
- Investigar o conteúdo de lipídeos totais na biomassa obtida a partir da condição selecionada;
- Avaliar a atividade enzimática da lipase na condição selecionada;
- Demonstrar a habilidade de *Aspergillus* Sp na biodegradação dos efluentes lácteos;
- Validar os resultados do planejamento fatorial através de software estatístico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Efluentes Industriais

Ao longo de décadas, a atividade industrial tem produzido rejeitos gasosos, líquidos e sólidos nocivos ao ambiente. Da mesma forma, processos industriais que utilizam grandes volumes de água contribuem significativamente com a contaminação dos corpos d'água, principalmente pela ausência de sistemas de tratamento para os grandes volumes de efluentes líquidos produzidos (FREIRE et al., 2000).

Elevadas concentrações de óleos e graxas nos efluentes afetam os processos de tratamento biológico de águas residuais através da formação de uma camada sobre a superfície da água, o que diminuiu a taxa de transferência de oxigênio para o processo aeróbio. Muitas destas substâncias ainda não têm um método adequado de tratamento estabelecido e assim, efluentes não eficientemente tratados, contendo ainda alta carga poluidora, tem sido descartado no meio ambiente o que pode ocasionar uma série de distúrbios ambientais DELLAMATRICE, (2005).

Com um maior rigor nos padrões de rejeite de águas residuais tem ocasionado à prática de pesquisas, cujo desígnio é reduzir o impacto ambiental, principalmente em efluentes contendo elevados teores de lipídeos, como os provindos de laticínios, matadouros e avícolas, enlatados, extração de óleos, etc. Os lipídeos contidos nesses efluentes interferem negativamente nos Sistemas de Tratamento de Efluentes. Elevadas concentrações de lipídeos resultam na formação de lodos com diferentes características físicas e reduzida atividade hidrolítica devido à flotação dessa biomassa, aumento do tempo de retenção hidráulica desses efluentes nas lagoas de estabilização, redução da capacidade de aeradores e elevada demanda de produtos flocculantes (FREIRE et al., 2000).

Dentro desta situação, métodos alternativos vêm sendo empregados na redução da concentração de lipídeos contidos nesses efluentes por meio de ação enzimática, particularmente lipases. Essas enzimas apresentam uma importância particular, pelo fato de hidrolisarem especificamente óleos e gorduras, o que pode ser de grande interesse para o tratamento de efluentes com alto teor de gordura MENDES, (2005).

O estabelecimento de leis internacionais que regulam a questão do gerenciamento ambiental, aliado à pressão por parte de governos e opinião pública, fez com que grandes esforços tenham sido dedicados ao desenvolvimento de tecnologias mais limpas para o tratamento de resíduos e a remediação de ambientes contaminados (BRITO et al., 2004).

Nos últimos anos, a legislação brasileira tornou-se restritiva quanto ao tratamento de efluentes lançados em corpos aquáticos. Segundo a Resolução nº 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, aos padrões e às exigências propostos.

Os sistemas convencionais de tratamento de efluentes, normalmente adotados na indústria, são divididos em quatro níveis distintos, (VON SPERLING, 2005): Tratamento preliminar, cujo objetivo é a remoção de materiais sólidos grosseiros; Tratamento primário, objetivando a remoção da matéria orgânica através da redução no teor de SST (Sólidos Suspensos Totais), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio); Tratamento secundário, para a remoção da matéria orgânica solúvel (DQO e DBO solúvel); Tratamento terciário, cujo objetivo é remover microrganismos ou poluentes específicos do clarificado (ZAWADZKI, 2011).

3.1.2 Efluentes Lácteos

As indústrias de laticínios são unidades fabris que processam o leite, produzindo os mais diversos derivados, entre estes o queijo. A fabricação de queijo é um método de transformação de componentes do leite em um produto de fácil conservação, menor volume, alto valor nutritivo, sabor agradável e boa digestibilidade (GRANDI, 1983). Neste processo não há conversão de 100% da matéria-prima leite no produto queijo. Seu rendimento pode variar entre 8,5 e 20% em função da consistência do queijo, produzindo assim, além do queijo, um derivado denominado de soro de leite. Este derivado lácteo apresenta em sua composição química aproximadamente 93-94% de água, 4,5-5,0% de lactose, 0,7-0,9% de proteínas solúveis, 0,6- 1,0% de sais minerais e quantidades apreciáveis de outros componentes como vitaminas do grupo B (GIROTO, 2001).

O soro de leite, quando considerado resíduo líquido industrial e despejado junto com os demais resíduos líquidos das indústrias de laticínios, pode significar a duplicação do sistema de tratamento, pois possui DBO entre 25.000 e 80.000 mg/L. Por apresentar alta concentração de matéria orgânica e deficiência de nitrogênio, sua estabilização por métodos convencionais de tratamento biológico é dificultada (LEITE, 2008).

Na produção de cada quilograma de queijo, partindo de 10 litros de leite, são gerados em média 9 litros de soro. Com um aspecto amarelo-esverdeado, contém cerca de 52% dos sólidos totais, 94% da lactose, 96% das proteínas solúveis e 38% dos minerais do leite. Quando encarado como efluente gera um alto custo para o seu tratamento, pois possui uma elevada demanda biológica de oxigênio (DBO), superior a 60.000 mg.O₂.L⁻¹ (BALDASSO et al., 2011). E, se não for tratado, representa o principal efluente poluidor das indústrias de laticínios. A concentração e a qualidade dos componentes do soro justificam a utilização do mesmo como fonte de matéria prima, e por isso vem despertando o interesse das indústrias (BALDASSO et al., 2011). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção anual de queijo é de 488 mil toneladas, se considerarmos um volume de 9 litros de soro para cada kg de queijo produzido, pode-se estimar um volume de aproximadamente 4,392 milhões de litros de soro de queijo.

O sorvete é um produto que agrada aos mais variados paladares, de todas as faixas etárias e de qualquer classe social. Sorvetes são alimentos refrescantes que combinam muito bem com o clima tropical do país, onde existe uma variada gama de ingredientes que podem ser usados para enriquecer e diversificar ainda mais as receitas de sorvetes, ingredientes estes que vão das frutas mais exóticas às sementes dos mais diversos tipos (ARBUCKLE, 1986).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sorvete ou gelado comestível é “um produto alimentício obtido a partir de uma emulsão de gordura e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo” (BRASIL, 2005).

Do ponto de vista nutricional, o sorvete é considerado um alimento completo e de alto valor nutritivo, pois fornece proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas A, B1, B2, B6, C, D, E e K, cálcio, fósforo e outros minerais. Independente da classificação, o sorvete é, devido às suas propriedades nutricionais, uma excelente fonte de energia, e por isto um alimento especialmente desejável para crianças em fase de crescimento e para pessoas que precisam recuperar peso. Pelo mesmo motivo, deve ter uma ingestão controlada ou evitada na dieta de pessoas que necessitam reduzir peso ou mesmo as que não querem ganhá-lo (MAIA et al., 2008).

De acordo com a Portaria nº379 da ANVISA (BRASIL, 1999) há exigências quanto à composição centesimal mínima de nutrientes nos sorvetes, só podendo ser intitulado com sorvete o produto alimentício que conter o mínimo exigido.

Classificação quanto à composição básica: Segundo a ANVISA (1999), os gelados comestíveis são classificados em:

- Sorvetes de creme: são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou gorduras comestíveis, podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares:

- Sorvetes de leite: são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos, podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares.

- Sorvetes: são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou outras matérias primas alimentares e nos quais os teores de gordura e/ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;

- Sherbets: são os produtos elaborados basicamente com leite e ou derivados lácteos e ou outras matérias primas alimentares, e que contém apenas uma pequena proporção de gorduras e proteínas, as quais podem ser total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;

- Gelados de frutas ou Sorbets: são produtos elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares;

- Gelados: são os produtos elaborados basicamente com açúcares, podendo ou não conter polpas, sucos, pedaços de frutas e outras matérias primas, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares.

- Gelados de frutas ou Sorbets: são produtos elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares;

- Gelados: são os produtos elaborados basicamente com açúcares, podendo ou não conter polpas, sucos, pedaços de frutas e outras matérias primas, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares. (GOFF, 1997) descreve que a estrutura espumosa do sorvete pode ser classificada como um complexo coloidal de alta consistência, constituído de três fases distintas: os glóbulos de gordura, as bolhas de ar e os cristais de gelo, que são os principais responsáveis pela qualidade do produto final. Do ponto de vista físico, o sorvete é um sistema multifásico complexo, no qual bolhas de ar, glóbulos de gordura parcialmente coalescidos e cristais de gelo estão dispersos em uma solução viscosa (KOXHOLT et al., 2001). Esses elementos formam uma rede tridimensional responsável pela estrutura do sorvete (BOLLIGER et al., 2000).

Do ponto de vista físico, o sorvete é um sistema multifásico complexo, no qual bolhas de ar, glóbulos de gordura parcialmente coalescidos e cristais de gelo estão dispersos em uma solução viscosa (KOXHOLT et al., 2001). Esses elementos formam uma rede tridimensional responsável pela estrutura do sorvete (BOLLIGER et al., 2000).

3.2 Tratamento Convencional de Efluentes com Alto Teor de Lipídeos

A escolha do método de tratamento depende basicamente da natureza do efluente. No entanto, os investimentos em capital, os custos operacionais, a área disponível para implantação do tratamento, o controle operacional e legislação ambiental devem ser também considerados (MENDES et al., 2005; GIORDANO, 2004).

Os sistemas convencionais de tratamento de efluentes, normalmente adotados na indústria, são divididos em quatro níveis distintos, a saber, (OLIVEIRA, 2005).

- Tratamento preliminar, cujo objetivo é a remoção de materiais sólidos grosseiros;
- Tratamento primário, objetivando a remoção da matéria orgânica através da redução no teor de SST (Sólidos Suspensos Totais), DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio);
- Tratamento secundário, para a remoção da matéria orgânica solúvel (DQO e DBO solúvel);
- Tratamento terciário, cujo objetivo é remover micro-organismos ou poluentes específicos do clarificado.

As operações unitárias envolvidas no tratamento preliminar apresentam-se todas como mecanismos de remoção física, tais como gradeamento, desarenação (remoção de areia), remoção de óleos e graxas por flotação, medição de vazão e equalização (METCALF; EDDY, 2003).

3.2.1 Tratamento Preliminar

As operações unitárias envolvidas no tratamento preliminar apresentam-se todas como mecanismos de remoção física, tais como gradeamento, desarenação (remoção de areia), remoção de óleos e graxas por flotação, medição de vazão e equalização (METCALF; EDDY, 2003). O tratamento preliminar consiste apenas em preparar o efluente para torná-lo passível de tratamento, através da remoção de materiais grosseiros como sólidos, fibras, areia, pedras e partículas de rápida flotação.

3.2.2. Tratamento Secundário

As regras de tratamento secundário abrangem etapas biológicas de redução da carga orgânica, através da retirada da DBO solúvel por meio de reações metabólicas, executadas por micro-organismos heterotróficos, aeróbicos, anaeróbicos ou facultativos, principalmente bactérias, fungos, rotíferos e protozoários. Segundo (ZAWADZKI, 2011). Estes micro-organismos representam a biomassa do sistema de tratamento. Neste processo, a energia necessária para as funções vitais é obtida a partir de uma fonte de carbono (matéria orgânica presente no efluente), que fornece o substrato necessário à geração de ATP (adenosina trifosfato).

3.2.3 Tratamento Terciário

O tratamento terciário de efluentes visa dar polimento ao clarificado, e tem como principal representante a desinfecção. Neste processo, o clarificado sofre a eliminação seletiva de organismos patogênicos, tais como bactérias, protozoários, vírus e vermes, tanto por cloração ou irradiação UV (ultravioleta) (ZAWADZKI, 2011).

3.2.4 Biorremediação

Os estudos de degradação de compostos químicos têm mostrado vários micro-organismos extremamente versáteis em catabolizar moléculas recalcitrantes. Trabalhos atuais em biotecnologia indicam fungos e bactérias como principais micro-organismos eficientes na degradação de poluentes, possuindo alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (BALAN, 2002).

Vários organismos podem ser utilizados na degradação, como bactérias, fungos ou plantas (biodegradação), e a eficiência de um ou outro depende, em muitos casos, da estrutura da molécula e da presença de enzimas hábeis em degradar o produto, as quais apresentam especificidade para a maioria dos substratos (ZAWADZKI, 2011). É por meio deste mecanismo que a biorremediação é efetivada. Este processo é mais provável quando a estrutura química do xenobiótico é semelhante à estrutura de moléculas naturais (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Biorremediação é um processo no qual organismo vivo, normalmente plantas, micro-organismos ou suas enzimas, são utilizadas tecnologicamente para remover (remediar) ou reduzir poluentes no ambiente. O processo metabólico que tem se mostrado mais apto em biodegradar moléculas xenobióticas (moléculas estranhas ao ambiente natural) recalcitrantes (moléculas de difícil degradação) nos processos de biorremediação, é o microbiano, uma vez que os micro-organismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando dos principais ciclos biogeoquímicos e representando, portanto, o suporte de manutenção da vida na Terra (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

3.3 Enzimas

As enzimas são unidades funcionais do metabolismo celular e são encontradas em vegetais, animais e microrganismos. São de natureza proteica e são formadas por subunidades ou aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas (NELSON & COX, 2002), atuando em seqüências organizadas, catalisando centenas de reações em etapas, através das quais as moléculas de nutrientes são degradadas e as macromoléculas são formadas através de precursores simples, de forma que a energia química da catálise possa ser conservada e transformada, equilibrando as atividades nos sistemas biológicos (NELSON; COX, 2002). As enzimas estão presentes em todas as células em pequenas quantidades, acelerando a velocidade de uma reação química sem serem alteradas no processo, permanecendo intactas no final de cada reação (CHAMPE; HARVEY, 1996).

O peso molecular das enzimas pode variar de 12.000 a mais de um milhão de Dalton (Da). Algumas podem ser modificadas através de ligação covalente, por processos como fosforilação e glicosilação entre outros envolvidos na regulação da atividade enzimática (NELSON; COX, 2002). Nem toda enzima necessita de um grupo químico, além dos resíduos de seus aminoácidos, outras requerem a presença de co-fatores que podem ser uma molécula orgânica complexa ou metalorgânica (coenzima) e/ou um ou mais íons inorgânicos (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+}) para concluir sua atividade enzimática (NELSON; COX, 2002).

O uso de enzimas nas indústrias possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006) e sem causar danos ambientais. Consequentemente, a demanda mundial destas enzimas tem crescido anualmente, sendo mais de 90 % do seu comércio efetuado pelos Estados Unidos, Europa e Japão. Mais de 4000 enzimas são conhecidas e aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a grande maioria de origem microbiana. Pelo menos 75% de todas as enzimas industrializadas são hidrolases e destas, 90% são produzidas por micro-organismos através de processos fermentativos. Depois das proteases e carboidrases, as lipases constituem o terceiro maior grupo em vendas no mundo (JAEGER et al., 1994, SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Atualmente, o maior setor da indústria biotecnológica consiste na produção e uso de enzimas de origem microbiana (bactérias, fungos e leveduras). As enzimas microbianas mais utilizadas industrialmente são, na sua maioria, extracelulares e obtidas de bactérias e fungos (filamentosos e leveduras), das quais se destacam a amilase (*Bacillus licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*), a glicoamilase (*Aspergillus niger*), a protease (*B. licheniformis*, *A. niger*, *Mucor mihei*, *M. pusillus*), a celulase (*Trichoderma viride*) e a pectinase, entre outras (JAEGER et al., 1994; OLSON et al., 1994). As enzimas microbianas podem desempenhar um papel essencial no processo de tratamento biológico de águas residuais, melhorando a qualidade do tratamento (FACCHIN et al., 2013). Diante de vários fatores como: baixo custo na produção, boa manipulação genética, crescimento rápido, as enzimas microbianas são frequentemente mais usadas do que as enzimas animais e vegetais. (BRANDELLI, A; SALA, L; KALIL, S. J, 20015). Além disso, a importância das enzimas microbianas tem sido cada vez maior, dado que não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento como ocorre com as enzimas vegetais e animais (COLEN, 2006; HASAN et al., 2006).

3.3.1 Mecanismo de Ação das Enzimas

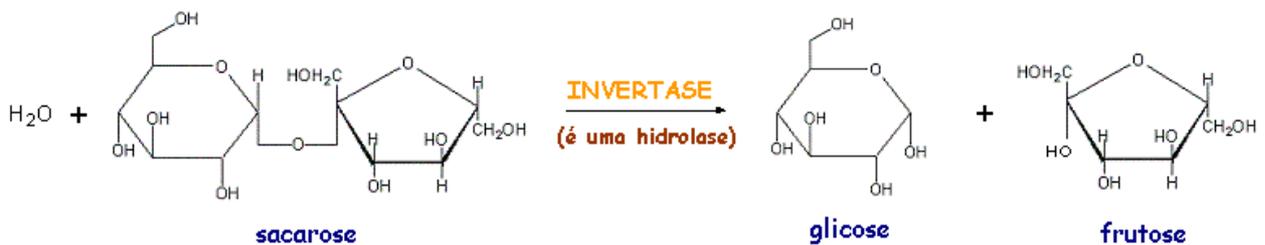
No funcionamento enzimático ocorre uma catálise durante a reação, alterando e favorecendo energeticamente a rota de reação alternativa, diferentemente das reações não catalisadas. O sítio ativo da molécula enzimática liga-se ao substrato, facilitando quimicamente a catálise (CHAMPE; HARVEY, 1996).

Na etapa inicial da catálise enzimática, ocorre a formação de um complexo enzima-substrato (ES). O substrato liga-se a uma região específica da enzima chamada de sítio ativo, contendo os radicais ou grupamentos catalíticos de aminoácidos que participam da quebra de ligações. As enzimas reagem através da formação do complexo enzima-substrato para formarem os produtos (CARLI, 2006; CHAMPE; HARVEY, 1996). Para exemplificar, podemos citar a transformação da sacarose (substrato) em dois produtos: glicose e frutose, sendo esta reação catalisada pela enzima invertase, como pode ser observado na Figura 1.

A catálise enzimática pode ser facilmente entendida através do modelo ilustrativo do mecanismo da chave fechadura proposto por Emil Fisher 15 em 1894, e do mecanismo do encaixe induzido de Koshland Jr. desenvolvido no final dos anos 60 (QUEIROZ, 2002; CARLI, 2006) (Figura 2).

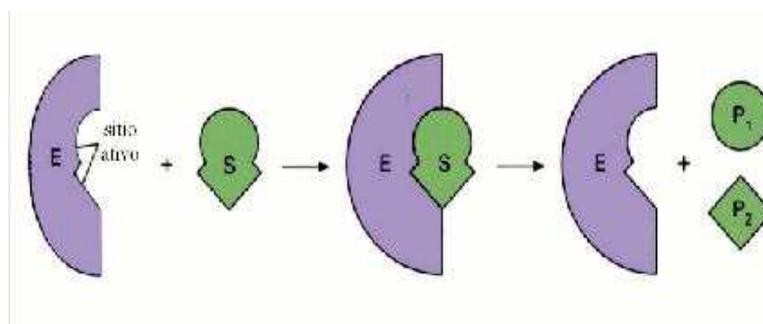
Se houver alterações na forma tridimensional de uma enzima, esta deixará de funcionar, pois não ocorrerá o encaixe dos substratos no sítio ativo. Já o modelo do mecanismo do encaixe induzido, proposto por Koshland Jr., prevê um sítio de ligação não totalmente pré-formado, mas sim moldável à molécula do substrato, ajustando a enzima ao substrato (CARLI, 2006; QUEIROZ, 2002). Nas reações catalíticas, as enzimas aceleram a velocidade da reação e diminuem a barreira energética entre reagentes e produtos que ocorrem por elas atraírem em orientações favoráveis os substratos no complexo enzima-substrato, (ES) (CARLI, 2006; QUEIROZ, 2002).

Figura 1. Representação esquemática da transformação do substrato (sacarose) em produtos (glicose e frutose), realizada pela enzima (invertase)



Fonte: CARDOSO *et al.*, 2009.

Figura 2. Modelo do mecanismo de chave fechadura proposto por Emil Fisher



Fonte: QUEIROZ, 2002

3.3.2 Enzimas no Tratamento de Efluentes

Enzimas são catalisadores biológicos e seu uso no tratamento de efluentes apresenta várias vantagens potenciais, tais como simplicidade e facilidade no controle do processo; não há necessidade de aclimação de biomassa; não há efeitos de choque por carga de poluentes; podem ser aplicadas em processos com baixa ou alta concentração de poluentes e operam em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade (KARAM, NICELL, 1997).

Muitas enzimas, de origem microbiana ou origem vegetal, são utilizadas no tratamento de efluentes e resíduos industriais para resolver problemas específicos. Assim, pode-se citar a remoção, por precipitação ou transformação, de compostos tóxicos ou recalcitrantes, e a alteração das características de um determinado efluente, como o aumento da biodegradabilidade ou diminuição da toxicidade, permitindo o tratamento posterior por processos biológicos convencionais ou a conversão de materiais em produtos de valor agregado (KARAM, NICELL, 1997).

As vantagens do tratamento enzimático de efluentes, frente aos tratamentos convencionais são (KARAM ; NICELL, 1997):

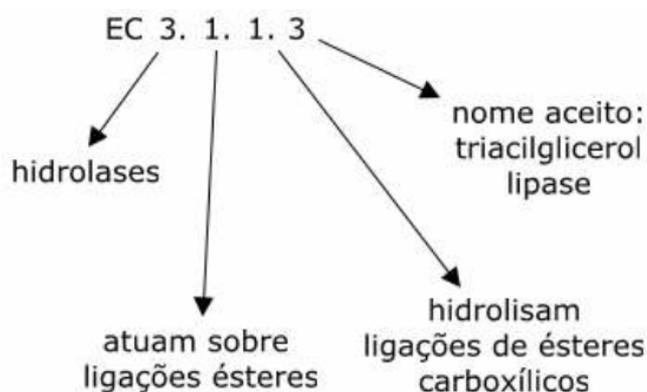
- Aplicação em processos com baixa ou alta concentração de poluentes;
- Operação em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade;
- Não há efeitos de choque por cargas de poluentes;
- Não há necessidade de aclimação de biomassa;
- O volume do lodo formado é menor, uma vez que há geração de biomassa;
- Simplicidade e facilidade no controle do processo.

3.3.3 Lipase

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à família das hidrolases, atuando na interface orgânica-aquosa demonstrando níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não-aquosos, ao contrario de outras enzimas (HASAN et al., 2004; MARTINS et al., 2008; SAXENA et al.,1999). Descrita na figura 3. A função biológica da lipase é catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilglicerídeos (TAG), formando ácidos graxos e glicerol, além de realizarem esterificação, isto é, a síntese reversa a partir de longas cadeias de ácidos

graxos e glicerol. Outra reação catalisada por lipase é a interesterificação, reação onde um ácido graxo, um álcool ou um éster reagem com o TAG produzindo diferentes TAG's. Dependendo do substrato da reação, esta também pode ser chamada de alcoólise, acidólise ou transesterificação (HASAN et al., 2004; MARTINS et al., 2008; SAXENA et al., 1999).

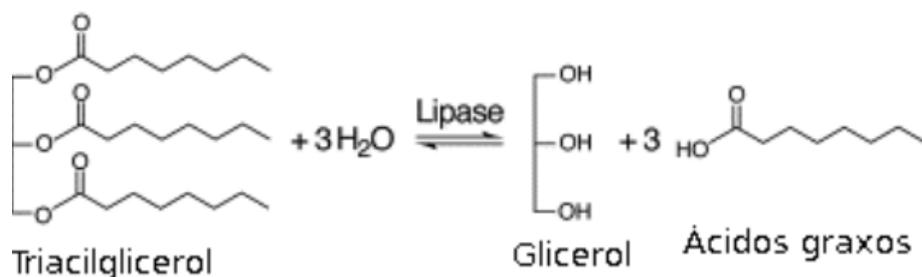
Figura 3. Classificação da lipase



Fonte: NC-IUBMB, 2011.

3.3.4 Propriedades da Lipase

As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis (Fig. 4), agindo apenas na interface óleo/água, podendo catalisar também reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos. As lipases também catalisam a formação de amidas a partir de ésteres não ativados. Estas enzimas podem ser confundidas com as esterases, porém as esterases são enzimas que agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lipídeos como as acilhidrolases, colesteroesterase e tioesterases (BORNSCHEUER et al., 2002; JAEGER, 1994; QUEIROZ, 2002; SAXENA et al., 1999; SHARMA et al., 2001).

Figura 4. Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases

Fonte: JAEGER & REETZ, 1998.

3.3.5 Aplicações da Lipase

As inúmeras aplicações industriais das lipases microbianas são decorrentes da versatilidade inerente às propriedades desta enzima. As lipases podem catalisar uma gama de reações, não precisam de cofatores, atuam em amplas faixas de pH e temperatura, possuem estabilidade em solventes orgânicos, e alta enantioseletividade (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). A seguir serão destacadas algumas aplicações industriais de lipases e outras potenciais aplicações descritas na literatura.

Devido à habilidade em hidrolisar gorduras, as lipases são utilizadas como aditivos nas formulações de detergentes. Para isso, as enzimas são selecionadas a fim de satisfazer as seguintes exigências: ter baixa especificidade em relação ao substrato, isto é, uma habilidade para hidrolisar gorduras de várias composições, habilidade de suportar as condições de lavagem relativamente severas (pH 10-11, 30 – 60°C) e habilidade de resistir a surfactantes e a enzimas como proteases, que são ingredientes importantes na formulação de detergentes (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Alguns exemplos de enzimas utilizadas em detergentes são a lipolase (Novozyme, Dinamarca), originada do fungo *Thermomyces lanuginosus* e expressa em *Aspergillus oryzae*, lumafast (Genencor, USA) e lipomax (Gist-Brocades, Holanda), lipases oriundas de *Pseudomonas mendocina* e *Pseudomonas alcaligenes* (JAEGER, 1994).

Durante a ação das lipases, qualquer tipo de interferências causadas na interface resulta em alterações na sua síntese e atividade. São vários os fatores que influenciam a síntese e as propriedades da enzima, entre eles fatores ambientais como a composição do meio de cultura, uso de estimuladores, indutores e inibidores, a concentração de oxigênio, nitrogênio e sais inorgânicos, a fonte de carbono, a

temperatura e o pH do meio de cultivo, a agitação e agentes capazes de afetar a interface (DOMINGUEZ et al., 2003)

3.3.6 Aplicação da Lipase no tratamento de efluentes com alto teor de lipídeos

Existe um grande interesse em utilizar lipase no tratamento de efluentes ricos em lipídeos, pois estas enzimas clivam triacilgliceróis específicos embora as lipases possam não ser tão específicas e catalisa a reação de hidrólise de triacilgliceróis, que possuem diferente composição de ácidos graxos, o que pode ser um atrativo para a remoção de óleos e gorduras de estações de tratamento que empregam lodo ativado (MENDES et al., 2005).

Os efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral possuem elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Neste contexto, processos alternativos que visam à recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídios, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (MENDES et al., 2005).

As lipases podem ser utilizadas diretamente na forma bruta (caldo fermentado) ou isoladas para promover um pré-tratamento do efluente antes da digestão anaeróbia. Entretanto, estudos têm sido realizados para verificar a possibilidade de cultivo de microrganismos produtores de lipases do gênero *Penicillium* em associação com a digestão do efluente de extração de azeite de oliva (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

As lipases agem na interface que separa as duas fases distintas, a qual corresponde em nível molecular a um grupo de duas camadas adjacentes de moléculas ordenadas, uma hidrofóbica e outra hidrofílica. Quanto maior a interface maior a quantidade de enzima adsorvida, aumentando a taxa de hidrólise (HASAN et al., 2006; MENDES et al., 2005).

Técnicas para melhoramento da eficiência em biodigestores incluem a instalação de caixas de gorduras ou de flutuadores, adicionando álcalis ou enzimas como as hidrolases e lipases para auxiliarem na remoção deste material gorduroso (HASAN et al., 2006; MENDES et al., 2005).

3.3.7 Fontes de Lipases

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal e microbiana (bactérias e fungos) (MARTINS et al., 2008). Nos animais, estas enzimas participam do metabolismo de lipídeos, como a digestão, a adsorção, a reconstituição de gorduras e também no metabolismo de lipoproteínas. Nas plantas, são encontradas em tecidos de reserva de energia (SHARMA et al., 2001).

Industrialmente e economicamente, as lipases microbianas apresentam uma série de vantagens em relação às lipases de origem animal e vegetal. As lipases de microrganismos são em sua maioria extracelulares, apresentando procedimento mais fácil de extração, isolamento e purificação tendo um custo de produção menor, são mais estáveis e possuem propriedades distintas das lipases de origem animal e vegetal (MARTINS et al., 2008; SHARMA et al., 2001).

Os fungos filamentosos produtores de lipase, comercialmente mais importante são pertencentes aos gêneros *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp. e *Rhizomucor* sp. A produção de lipases por fungos filamentosos varia de acordo com a tensão, a composição do meio de crescimento, condições de cultura, o pH, temperatura, e o tipo de fontes de carbono e nitrogênio. (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004).

3.3.8 Micro-organismos produtores de Lipase

As lipases microbianas são principalmente extracelulares e a sua produção é muito influenciada pela composição do meio, além factores físico-químicos, tais como temperatura, pH, e oxigénio dissolvido. O factor importante para a expressão de atividade da lipase sempre foi relatado como o carbono fonte, uma vez que as lipases são enzimas induzíveis. Estas enzimas são geralmente produzidas na presença de um lípideo, tais como o óleo ou qualquer outro indutor, tal como os triacilgliceróis, ácidos

gordos, ésteres hidrolisáveis, tweens, sais biliares, e glicerol (GUPTA et al., 2004; SHARMA et al., 2001).

Fontes de carbono lipídicas parecem ser essenciais para a obtenção de um alto rendimento de lipase. No entanto, fontes de nitrogênio e micronutrientes essenciais também deve ser cuidadosamente considerada para o crescimento e otimização da produção. Estes requisitos nutricionais para o crescimento microbiano são preenchidos por várias alternativas de meios como os baseados em compostos definidos (sintético médio) como açúcares, óleos e componentes complexos, como peptona, extrato de levedura, extrato de malte da maldia, e também agroindustrial resíduo que contém todos os componentes necessários para o desenvolvimento de microrganismos. Uma mistura destes dois tipos dos meios de comunicação podem também ser utilizada para os fins da lipase produção. Os principais estudos disponíveis na literatura desde 2005, abrangendo estes assuntos são apresentados a seguir, divididos pelo tipo de meio utilizado.

Micro-organismos produtores de lipases têm sido encontrados e isolados nos mais diversos habitats, dentre os quais e possível citar os resíduos de indústrias de óleos vegetais, de laticínios, do solo contaminado com óleo, das sementes de oleaginosas, dos alimentos em decomposição, das caixas de gordura e das pilhas de compostagem. A referida colônia pode ser transferida para um novo meio de cultivo onde crescerá concomitantemente a outros micro-organismos.

Segundo SHARMA, CHISTI E BANERJEE (2001), após o isolamento e a seleção das cepas produtoras de lipase, o principal método utilizado para a produção desta enzima e através do uso de cultivo submerso. Contudo, o cultivo em meio sólido também pode ser utilizado. Vem sendo demonstrado que o cultivo em meios sólidos acarreta na obtenção de uma maior produtividade enzimática. Além disso, o produto final é mais concentrado e com maior estabilidade, existem menores chances de contaminação do meio, uma vez que o conteúdo de água é menor e os micro-organismos encontram-se, de um modo geral, mais adaptado a esse tipo de meio. Por outro lado, existem fatores que desmotivam o uso das técnicas de cultivo sólido e que estão relacionados a dificuldades para o escalonamento a nível industrial.

As lipases com aplicações comerciais são obtidas predominantemente de fungos através do cultivo submerso dos mesmos. Os fungos filamentosos se

caracterizam por excretar quantidades significativas de lipases, sendo que, de um modo geral, a produção de tais enzimas esta relacionada a respostas de estímulos ambientais (ILLANES, 2008).

As lipases excretadas pelos fungos filamentosos podem ser separadas da massa micelial através de centrifugação ou filtração (RAPP; BACKHAUS, 1992). Um reduzido número de fungos filamentosos e conhecido por possuir, ligado ao seu micelio, as lipases, dentre os quais e possível citar fungos do gênero *Rhizopus* (WANG; XU; SHAN, 2008).

Os fungos filamentosos devem crescer em um meio de cultivo constituído por nutrientes necessários para o crescimento do microorganismo e a produção de metabolitos. Dessa forma, este meio deve ser adequado para suprir energia para biossíntese e manutenção celular, sendo composto basicamente por fonte de carbono, fonte de nitrogênio (orgânico ou inorgânico), sais orgânicos, vitaminas e indutores, quando necessários para a produção de lipase, visto que existem lipases induzíveis e constitutivas.

As lipases constitutivas são aquelas que são produzidas independentes do meio de cultura onde os micro-organismos se encontram. Já as lipases induzíveis tem sua produção estimulada pela presença de algum indutor presente no meio de cultivo (PINHEIRO, 2006). Os fungos filamentosos também são bosn produtoras de surfactantes, os biossurfactantes ou surfactantes de origem microbiana são agentes tensoativos com capacidade de detergência, emulsificação, dispersão de fases, que podem ser aplicados em processos de descontaminação de ambientes poluídos com lipídios. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (NITSCHKE ; PASTORE , 2002).

A maioria dos surfactantes em uso é derivada de petróleo, porém o interesse por surfactantes microbiológicos tem aumentado devido a sua diversidade, características ambientais favoráveis, possibilidade de produção através de fermentação e potencial aplicação em diversas áreas do setor industrial (PINTO ;MARTINS; COSTA, 2009).

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, detergência, capacidade

espumante, solubilização e dispersão de fases (LIMA, 1996). Os biossurfactantes vêm sendo testados em aplicações ambientais como a biorremediação, dispersão de efluentes oleosos, otimização de recuperação de óleos e transferência de óleo cru, e são potenciais candidatos a substituir surfactantes químicos no futuro, especialmente em indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, produtos de limpeza industriais e em produtos químicos agroindustriais (MAKKAR ; CAMEOTRA, 2002).

3.4 Gênero *Aspergillus*

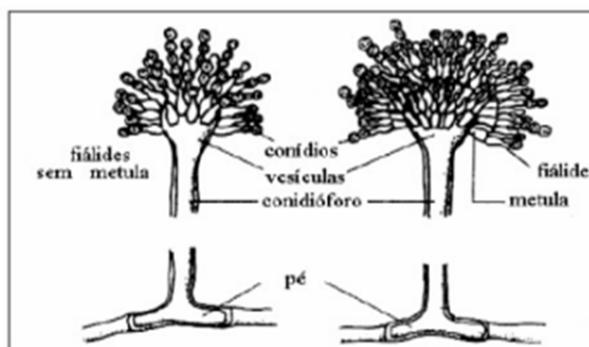
O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli, em seguida os autores Tom e Church em 1926, publicaram a primeira monografia sobre o gênero, as espécies pertencentes a esse gênero ficaram cada vez mais conhecidas e passou a ser um dos grandes gêneros de fungos estudados. Uma descrição completa sobre o gênero foi realizada por Rapper e Fennel em 1965, onde foi reconhecido cerca de 132 espécies e 18 variedades (BENNETT, 2010; GEISER et al., 2007).

Atualmente o gênero *Aspergillus* compreende mais de 260 espécies, embora esse gênero tenha sido estudado desde 1729, a sistemática está em um estado de fluxo, além das características morfológicas e da utilização das técnicas moleculares, as espécies podem ser caracterizada através de seus perfis de metabólitos secundários, coloração dos conídios, por sua taxa de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água, através de seu crescimento no meio de cultura Creatine Sucrose Agar - CREA (SAMSON; VARGA, 2009) (Figura 5).

Em relação à morfologia do gênero, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração, sendo então principal característica macroscópica utilizada para classificação, sendo encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco. Espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* podem ser divididas em seções: Flavi, Circumdati, Nigri, Restricti, Fumigati, Cervini, Clavati, Nidulantes, Flavipedes, Versicolores, Usti, Terrei, Candidi, Cremei, Sparsi e Wentii. As espécies mais comumente estudadas pertencem às seções Circumdati, Flavi e Nigri, são economicamente importantes, pois, algumas produzem micotoxinas (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

Em relação à importância econômica, *Aspergillus* é um dos gêneros de fungos economicamente mais importantes, muitos isolados são utilizados na produção de diversos produtos, porém algumas espécies são responsáveis por diversas desordens em várias plantas, são considerados patógenos oportunistas, entre os patógenos comuns encontram-se as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (VARGA et al., 2004).

Figura 5. Morfologia representativa da espécie do gênero *Aspergillus*



Fonte Adaptado: ROCHA, 2010.

3.4.1 *Aspergillus parasiticus*

De acordo com FRANCO e LANDGRAF, 2005, os principais gêneros de fungos de interesse em alimentos são: - *Aspergillus*: algumas espécies, como *A. glaucus* e *A. repens*, agem como deteriorantes de alimentos. Espécies como, *A. orizae* e *A. soyae*, são benéficas na produção de alimentos, assim como *A. niger* é utilizado para a produção comercial de ácidos cítricos, glucônicos e gálico, beta-galactosidase, glicoamilase, lipases e pectinases. Porém as espécies, *A. flavus* e *A. parasiticus*, são produtoras de micotoxinas.

Entre esses principais fungos toxigênicos o gênero *Aspergillus* está disperso amplamente no ambiente e agrupa, aproximadamente, 266 espécies, porém as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* são encontradas frequentemente na agricultura e medicina sendo os principais fungos produtores de toxinas encontrados em muitas amostras de grãos e seus derivados (FRAGA et al., 2008; GERBALDO et al., 2011).

A. flavus e *A. parasiticus* Reino: Fungi Filo: Deuteromicota Classe: Eurotiomicetes Ordem: Eurotiales Família: Trichocomaceae Gênero: *Aspergillus* Espécie: *A. flavus* e *A. parasiticus*. *A. flavus* e *A. parasiticus* são caracterizados por

apresentarem colônias de coloração verdes a amarelo-olivas, tornando-se acinzentadas com a idade. Morfologicamente apresentam um estipe não septado com parede grossa e ápice largo terminando em vesícula, que pode ser classificada de unisseriada quando existem somente as fiálides ou, bisseriada (PITT; HOCKING, 1997). Quanto à diferenciação das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, a primeira possui a morfologia da cabeça conidial variável e produz conídios bastante variáveis na forma e no tamanho, com paredes relativamente finas, podendo ser muito ou pouco rugoso; a segunda apresenta vesículas unisseriadas e conídios esféricos e com paredes rugosas (PITT; HOCKING, 1997).

Apesar de *A. parasiticus* ser mais limitado geograficamente do que *A. flavus*, ambos podem ser encontrados em muitos substratos, tais como amendoim, milho, sementes de algodão, sementes oleaginosas, trigo, girassol e sorgo (PITT; HOCKING, 1997). Segundo estudo realizado por VAAMONDE et al., (2003), dos 130 isolados de diferentes substratos (67 amendoim, 43 soja e 20 trigo) a espécie *A. flavus* foi dominante em todos, entretanto em amendoim foi obtida quase a mesma proporção entre *A. flavus* e *A. parasiticus*. Outro estudo em amendoim, relatou uma frequência maior de *A. flavus* que de *A. parasiticus* (GONÇALEZ, et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- ALBERTON, D. et al. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technol**, v.48, p.28-35, 2010.
- ALVES, R. L. D Projeto da Rede de Captação Logística do Soro de Queijo Produzido no Estado de Minas Gerais. Minas Gerais: Departamento de Engenharia Elétrica e Produção. Universidade Federal de Viçosa, 2005. 33 p. Dissertação (Conclusão de curso).
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Biosci Uberlândia**, v. 23, n. 3, p. 66-75, July./Sept. 2007.
- ARBUCKLE, W.S. Ice cream, 4 ed. **Avi publishing th Co. Inc.**, West Port, Connecticut, p. 40, 187, 207- 212, 317-322 - 365.1986.
- ARCHELA, Edison et al. Considerações sobre a geração de efluentes líquidos em centros urbanos. **GEOGRAFIA (Londrina)**, v. 12, n. 1, p. 517-526, 2010.
- ATLAS, Ronald M. Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 149-156, 1991.
- BALAN, R. et al. The case for cyber foraging. In: Proceedings of the 10th workshop on ACM SIGOPS European workshop. ACM, 2002. p. 87-92.
- BALDASSO, C. Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas. Porto Alegre: Escola de Engenharia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 179 p. Dissertação (Mestrado).
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1, p. 381-386, 2011.
- BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Revista Uniabeu**, Alagoas, v. 5, n. 10, p.181-195, 2012.
- BENNET, J. W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. 2010. Disponível em: Biodiversidade da caatinga: Ações prioritárias para a conservação. Brasília, DF. Acesso em 06 de junho de 2014.
- BOLLIGER, S.; GOFF, H.; THARP, B. Correlation between colloidal properties of ice cream mix and ice cream. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 04, p. 303-309, 2000.
- BON, E.P.S. et al. Apresentação. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. (Ed.) Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 73-81, 2002. PMID:12007643. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00599.x>

BRANDELLI, A; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, 2015.

BRASIL (2005) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 266, 22 set. 2005. Regulamento Técnico para Gelados Comestíveis e Preparados para Gelados Comestíveis. Diário Oficial da União de 23 set. 2005, Seção 1. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18825&word=>>>.

BRITO, N. N. et al. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 4., 2004, Rio Claro. Anais. Rio Claro: Faculdades Integradas Claretianas, 2004.

BRONSTEIN, V.; ALEGRE, R. M. Estudos dos parâmetros da ultrafiltração de permeado de soro de queijo fermentado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.18, n. 1, 1998.

CARDOSO, C.L.; MORAES, M.C.; CASS, Q.B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32(1), p. 175-187, 2009.

CARLI, I.C. Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lipases imobilizadas em suporte sólido. Dissertação (Mestrado), Universidade Regional de Blumenau- FURB, Blumenau, 2006.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; MARTINS DA SILVA, D. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n. 1, p.75-80, 2003.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27(1), p. 146-156, 2004.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Bioquímica ilustrada. Ed. Artmed, 2ª ed. Porto Alegre, 1996.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, p. 193–197, 2004.

COLLA, L. M; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. APLICAÇÕES E PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2013.

CONAMA, no uso de suas atribuições que lhe confere o art. 7º, inciso IX, do Decreto 88.351, de 1º de junho de 1983, e o que estabelece a RESOLUÇÃO CONAMA nº 003, de 5 de junho de 1984; *Current Science*, v. 77, p.101-115, 1999.

DELLAMATRICE, P. M. Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana. 137 f. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005 .

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rizopus arhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2000.

FACCHIN, S. et al. Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. **Open Journal of Ecology**, 3, 34-37. doi: 10.4236/oje.2013.31005. 2013.

FRAGA, M .E.; GATTI, M. J.; ROSA, R.C. A. *Aspergillus* da Seção Flavi – Proposta de uma chave dicotômica. Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. In SCUSSEL, V.M. et al. Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de grãos II. 1º ed. ABMAG. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 2008.

FRANCO, B.D.G.DE M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo Ed. Atheneu, p. 182, 2005.

FREIRE, R. S. et al. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 8, n. 34, jan./jun. 2005. Disponível em:<<http://www.biotecnologia.com.br/edicoes/ed34.php>>. Acesso em: 10 set. 2014.

GEISER, D. M. et al. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 1-10, 2007.

GERBALDO, G.A.; PEREYRA, C.M.; CAVAGLIERI, L.R.; RUIZ, F.; PASCUAL, L.; DALCERO, A.M.; BARBERIS, I.L. Surveillance of Aflatoxin and Microbiota Related to brewer's Grain Destined for Swine Feed in Argentina. **Veterinary Medicine International**, p. 7, 2011.

GIONGO, V; JARBAS. T; CUNHA. F; MENDES. A. S. M; GAVA, C. A. T. Carbono no Sistema Solo-Planta no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia Física**, p. 1233-1253, 2012.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, Setembro/Outubro, p. 43-46, 2001.

GIROTTO, Vittorio et al. Inept reasoners or pragmatic virtuosos? Relevance and the deontic selection task. **Cognition**, v. 81, n. 2, p. B69-B76, 2001.

GOFF, H. D. 65 Years of ice cream science. **International dairy journal**, v. 18, n. 7, p. 754-758, 2008.

GONÇALEZ, E.; NOGUEIRA, J.H.C.; FONSECA, H.; FELÍCIO, J.D.; PINO, F.A.; CORRÊA, B. Mycobiota and mycotoxins in Brazilian peanut kernels from sowing to harvest. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p.184-190, 2008.

GRANDI, J. G. Leite fermentado, manteiga e queijo. In: AQUARONE, Eugênio (Coord.) Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo. Editora Edgar Blucher Ltda., 1983. v. 5 p.123-143.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 763-781, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

ILLANES, Andrés (Ed.). Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Springer Science, 2008. 391 p. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/978-1-4020-8360-0#section=213599&page=8&locus=47>>. Acesso em: 07 jun. 2014.

JAEGER, K.E. et al. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994

JAEGER, L; M, F; WESTHOF, Eric. Involvement of a GNRA tetraloop in long-range RNA tertiary interactions. **Journal of molecular biology**, v. 236, n. 5, p. 1271-1276, 1994.

KARAM, Jean; NICELL, James A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 141-153, 1997.

KOXHOLT, M.; EISEMANN, B.; HINRICHS, J. Effect of the fat globule size on the meltdown of ice cream. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 31-37, 2001.

LEITE, J. L. B. Comércio Internacional de Lácteos. Capítulo 6: O comércio internacional de soro de leite. Editora Templo, 2ª Ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2008. 350p. p 119-129

LIMA, B. F. et al. Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *aspergillus* sp isoladas da caatinga de pernambuco. **e-Xacta**, v. 7, n. 1, 2014.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAIA, M. C. A.; GALVÃO, A. P. G. L. K.; MODESTA, R. C. D.; JÚNIOR, N. P. -

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new application. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 58, 428-434, 2002.

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

MELLO, C. M. A; SILVA, I.R; PONTES, J.S; GOTO, B.T; SILVA, G.A; MAIA, L.C. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Natal Rn, v. 26, n. 4, p.938-943, 20 jul. 2012.

MENDES, A.A; CASTRO, H.F. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

METCALF & EDDY. Wastewater Engineering: treatment and reuse. Metcalf & Eddy Inc. 4ª ed. 2003.

NELSON, D.L; COX, M.M. Lehninger - Princípios de Bioquímica, 3ª ed, p. 189-224, Sarvier, 2002.

NWOBI, BE; OFOEGBU, O.; Adesina, OB Extração e avaliação qualitativa do óleo de semente de laranja doce Africano. **Revista Africano de alimentos, agricultura, nutrição e desenvolvimento**, v 6, n. 2, de 2011.

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

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PACHECO, S. V. et al. Produção, caracterização e imobilização de lipase de fungo filamentosos isolado do efluente de abatedouro de frangos. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2013.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 995-1006, 2012.

PINHEIRO, T. L.F. Produção de lipases por Fermentação em Estado Sólido e Submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. 2006. 120f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Setor de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI. Erechim, 2006.

PINTO, M. H.; Martins, R.G; Costa, J.A.V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v.32, n.8, p. 2104-2108, 2009.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. 3rd edition. Springer. 1997.

QUEIROZ, N. Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisadas por lipases. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

RAPP P, BACKHAUS S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast and bacteria. **Enzyme Microb Technol.** 1992; 14: 938-943

RIGO, E, et al. Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. Dissertação (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RIGO, E. Aplicações de lipases como auxiliar no pré tratamento de efluentes de frigoríficos de suínos e bovinos. Dissertação (Mestrado), URI, Erechim, RS, 2004.

ROSA, D.R. et al. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology.** v.100, p.6170–6176, 2009.

SAMSON, Robert A.; FRISVAD, Jens Christian. Penicillium subgenus Penicillium: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in mycology**, v. 49, 2004.

SAXENA, R. K. et al. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 101-115, 1999.

SERPA, L.; PRIAMO, W. L.; REGINATTO, V. Destino Ambientalmente Correto e Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica. **2nd International workshop advances in cleaner production.** São Paulo, 2009.

SETH, Sonali et al. An insight into plant lipase research—challenges encountered. **Protein expression and purification**, v. 95, p. 13-21, 2014.

SHARMA, R.; CHISTY, Y.; BANERJEE, U. C. Production purification, characterization and application of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p.627-662, 2001.

SILVA, J. M. C. da, TABARELLI, M., FONSECA, M. T. da e LINS, L. V. species. **European Journal of Plant Pathology, Dordrecht**, v. 110, p. 627–640,

STEHR, F. et al. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 347-355, 2003.

VARGA, Janos et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. In: **Molecular Diversity and PCR-detection of Toxicogenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi.** Springer Netherlands, 2004. p. 627-640.

VILLENEUVE, D. L. et al. Relative potencies of individual polychlorinated naphthalenes to induce dioxin-like responses in fish and mammalian in vitro bioassays. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 39, n. 3, p. 273-281, 2000.

YAN, J. et al. Preparation of cross-linked lipase-coated micro-crystals for biodiesel production from waste cooking oil. **Bioresour. Technol.**, 102 (2011), p. 4755–4758

YANG, K. S.; SOHN, J-H.; KIM, H. K. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, p. 599-604, 2009.

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

CAPÍTULO II



ISSN: 1984-3151

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Aspergillus parasiticus* UCP 1281 NO BIOTRATAMENTO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS

EVALUATION OF BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF *Aspergillus parasiticus* UCP 1281 IN THE WASTEWATER BIOTREATMENT OF DAIRY INDUSTRY AND LIPIDS PRODUCTION

**Roberta Leite Santos Reis¹; Nairane da Silva Rosa Leão²; Adriana Ferreira de Souza³
Grayce Kelli Barbosa da Silva⁴; Marcos Antônio Cavalcanti Luna⁵; Carlos Alberto Alves
da Silva⁶; Kaoru Okada⁷**

- 1 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. robertalsreis@yahoo.com.br
- 2 Mestranda em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. Nairane.rs@hotmail.com
- 3 Mestranda da Pós-Graduação em Biologia de Fungos – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Adrife.souza@gmail.com
- 4 Doutoranda em Ciências Biológicas, – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Grayce_kelli@yahoo.com.br
- 5 Doutoranda em Biotecnologia, Rede de Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Universidade Federal Rural de Pernambuco. macluna@bol.com.br
- 6 Doutor em Biotecnologia. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. calves@unicap.br
- 7 Doutora em Medicina, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco. kao@unicap.br

RESUMO: Neste trabalho foi realizado a identificação de *Aspergillus* sp (SIS 16), isolado de amostra do solo da região da Caatinga no estado de Pernambuco, e avaliado o potencial biotecnológico deste, no biotratamento de efluentes da indústria láctea. O isolado foi identificado, através das características macroscópicas e microscópicas como *A. parasiticus* (UCP1281). O potencial para biotratamento de efluentes ricos em lipídeos foi analisado avaliando a produção de lipase por *A. parasiticus* (UCP1281) através de fermentação submersa em agitador orbital em meio padrão, na presença de óleo de oliva 0,5 g/L durante 120 horas nas temperaturas de 28°C e 37°C, 150 rpm. Foram determinados a curva de crescimento, pH e atividade lipolítica. Os resultados obtidos evidenciaram que com 96h, a 28°C foi obtida a melhor atividade lipolítica alcançado 5,2 U/mL. Considerando os resultados, foram realizados os ensaios utilizando os resíduos da indústria láctea (soro de leite e resíduo de sorvete) através de um planejamento fatorial completo de 2² utilizando as mesmas condições do ensaio anterior. Foram determinados também além dos parâmetros anteriores, o percentual de lipídeos acumulado na biomassa de *A. parasiticus* (UCP1281). Os resultados obtidos evidenciaram que a melhor condição foi no ensaio 4 (45% de resíduo de sorvete e 30% de soro de leite), com produção de biomassa de 68,1 g/L, a atividade lipolítica de 20,0 U/mL e o maior percentual de acúmulo de lipídeos na biomassa 67.61%. Os resultados demonstraram o potencial deste isolado no biotratamento de efluentes da indústria láctea, assim como para a produção de lipídeos, uma vez que o micro-organismo converteu eficientemente o soro de leite e o resíduo de sorvete em biomassa com alto percentual de lipídeos nas suas células.

PALAVRAS-CHAVE: Fungo filamentosos, Caatinga, atividade lipolítica.

ABSTRACT: *In this work, the identification of Aspergillus sp (SIS 16), isolated from the soil sample in Caatinga region in the state of Pernambuco, and rated the biotechnological potential of it in the biotreatment of dairy industry effluents. The identification took place through the macroscopic and microscopic characteristics as A. parasiticus (UCP1281). The potential for biotreatment of wastewater rich in lipids was analyzed by evaluating the lipase production by A. parasiticus (UCP1281) through submerged fermentation in an orbital shaker in standard medium in the presence of olive oil 0.5 g/l for 120 hours at temperatures 28 °C and 37 °C, 150 rpm. Were determined the growth curve, pH and lipase activity. The results showed that with 96 hours, at 28 °C was obtained the best lipase activity reached 5.2 U/mL. Considering the results, were performed assays using waste from the dairy industry (whey and cream residue) through a full factorial design of 2² using the same conditions as the previous test. Were also determined in addition to the above parameters, the cumulative percentage of lipid in the biomass of A. parasiticus (UCP1281). The results showed that the best condition was the test 4 (45% of ice cream residue and 30% whey), with biomass of 68.1 g/L, the lipase activity of 20.0 U/mL and the highest percentage of lipid accumulation in biomass 67.61%. The results demonstrated the potential of this isolate in the biotreatment of dairy industry effluents, as well as for the production of lipids, since the microorganism efficiently converted whey cream and waste biomass with a high percentage of lipids in their cells.*

KEYWORDS: *Filamentous fungi, Caatinga, lipolytic activity*

1 INTRODUÇÃO

O solo armazena organismos vivos e proporciona altas taxas metabólicas que ocorrem em seu interior, por existirem raízes e a presença de decomposição da matéria orgânica. É nesta região, a rizosfera, onde existe uma maior atividade microbiana, em razão da presença de exsudatos e secreções radiculares, que representam a maior parte do carbono disponível para os micro-organismos. Sem a influência das raízes e da atividade da biota que funcionam de forma simbiótica, o solo pode ser considerado oligotróficos ou relativamente pobre em fontes de carbono disponíveis (ARAÚJO, MONTEIRO, 2007; BARROS, 2012; PLANTE, STONE, MCGILL, 2014).

O isolamento de novos micro-organismos de ambientes onde se conhece pouco da biodiversidade microbiana, como a Caatinga nordestina, tem incentivado nas últimas décadas um aumento nos estudos de bioprospecção microbiana voltada para pesquisas envolvendo o potencial biotecnológico desses organismos e assim proporcionar a descoberta de novos produtores de compostos bioativos de alto

valor agregado (LIU et al., 2012; SMRITHI et al., 2013; MONCIARDINI et al., 2014).

A Caatinga é um ecossistema do sertão nordestino. Estende-se por cerca de 735.000 Km², sendo limitada a leste e a oeste pelas florestas Atlântica e Amazônica, respectivamente, e ao sul pelo Cerrado. Apresenta um clima semi-árido, quente e com baixos índices pluviométricos, baixa umidade relativa do ar e altas temperaturas durante quase todo o ano (COSTA et al., 2014).

O interesse pela produção de enzimas e o avanço da tecnologia enzimática vem aumentando gradativamente nos últimos anos, favorecendo o desenvolvimento de áreas na engenharia de proteínas, contribuindo assim para a ampliação do uso de enzimas, principalmente as de origem microbianas, nos processos industriais.

As enzimas que hidrolisam os lipídios são denominadas de lipases e podem ser encontradas em animais, vegetais e micro-organismos (CASTRO et al., 2004; LEE et al., 2004; VADLAMANI PARCHA, 2011; BRANDELLI, SALA, KALIL, 2015). As lipases

microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade de substratos, o que as tornam muito atrativas para aplicação industrial (ROVEDA, HEM KEMEIER, COLLA et al., 2014). A produção de lipases nos micro-organismos pode ser influenciada diretamente por diferentes fatores como fonte de carbono, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e pH do meio, e condições de aeração (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006; CAMMAROTA, FREIRE, 2006; MARTINS, KALIL, COSTA, 2008; LIMA et al., 2014).

A produção de lipase por fungos filamentosos tem sido estudadas através de fermentação submersa (FS) e fermentação estado sólido (FES). Embora a FS seja mais comum nos processos industriais, a FES tem sido explorada principalmente devido às vantagens, como espaços requeridos e efluentes produzidos. E para os fungos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus*, a FES apresenta condições similares ao seu habitat natural (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* se destacam como excelentes produtores de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental, pois apresentam uma elevada taxa de crescimento e um grande termo tolerância, o que favorece estudos de seleção e produção de bioprodutos de alto valor agregado (GOPINATH et al., 2013; MALDONATO, MACEDO, RODRIGUES, 2014).

Inúmeras espécies de *Aspergillus* têm sido relatadas para a produção de lipase (CONTESINI et al., 2010; DAMASCENO; CAMMAROTA; FREIRE, 2012; DUMORE, MUKHOPADHYAY, 2012; SINGH, MUKHOPADHYAY, 2012; COLLA et al., 2014; DOBREV et al., 2014).

As lipases têm sido empregadas em sistemas para o pré-tratamento e tratamento de efluentes com altas concentrações de óleos e gorduras (CAMMAROTA et al., 2006). Efluentes industriais gerados em

refrigeríficos, abatedouros, indústrias de alimentos e laticínios, em geral possuem elevados teores de demanda bioquímica e química de oxigênio (DBO e DQO), tendo em vista que o conteúdo de gorduras aumenta a concentração de matéria orgânica. Diversos estudos realizados utilizando os resíduos desses efluentes para formulação de meios de produção têm obtido sucesso, principalmente utilizando o planejamento fatorial para minimizar a quantidade de experimentos e os custos de elaboração de meios de produção (LIU et al., 2008; NOTARNICOLA et al., 2012; JOSHI, WALIA, RANA, 2012; HOSSEINPOUR et al., 2012; PANESAR, KENNEDY, 2012; LIN et al., 2013; WANG et al., 2013; AGGELOPOULOS et al., 2014; PLEISSNER et al., 2014; MARQUES et al., 2014).

A viabilidade da utilização de fungos na produção lipídicos para diversos fins (biodiesel, ácidos graxos, bio-óleo) e de SCP (*single cell protein*) tem sido demonstrados por inúmeros autores (ABU-ELREESH et al., 2013; NANGUL et al., 2013; ABU-ELREESH; ABD-EL-HALEEM, 2014; BABU et al., 2014; HANJA et al., 2014).

Neste trabalho foi realizada a identificação da amostra de *Aspergillus* sp (SIS 16) e a avaliação do potencial da amostra no biotratamento de efluentes da indústria láctea através do crescimento, atividade lipolítica e a capacidade de produzir e acumular lipídicos na biomassa.

2 MATERIAL DE MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo foi isolado de amostra do solo da Caatinga, município de Serra Talhada, mesorregião Sertão – PE, sendo codificado como SIS 16. Mantido no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP).

2.2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A identificação e a caracterização morfológica da amostra foi realizada através da metodologia descrita por Klick (2002), através da chave para identificação da espécie. A amostra foi cultivada nos meios Agar Czapek autolisado de levedura – (CYE) (PITT, 1979) a 25°C e 37°, e Extrato de Malte Ágar (MEA) a 25°C. As características macroscópicas foram determinadas pela textura da colônia, grau de esporulação, cor dos conídios, textura e cor do micélio, presença de cores, pigmentos e exsudado.

Para análise microscópica foram preparadas lâminas, para observação das estruturas microscópicas como: comprimento, largura e textura dos conidióforos, forma da cabeça conidial, diâmetro da vesícula, comprimento das métulas e fiáides, diâmetro, forma, textura presença ou ausência de conídios e ascósporos, forma e cor do cleistotécio/esclerócios.

2.3 PRÉ-INOCULO

Foram utilizadas placas de Petri contendo o meio ágar Sabouraud (acrescido de azeite de oliva para aclimação) e incubadas a 28°C durante 7 dias.

2.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E DE PRODUÇÃO DE LIPASE EM MEIO CONVENCIONAL

A cinética de crescimento e produção de lipase foram realizadas através de fermentação submersa, utilizando uma concentração de células padronizada de 10^7 esporos/mL, em 100 ml de meio convencional (glicose (0,25 g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,05 g/L); K_2HPO_4 (0,175 g/L g); extrato de levedura (0,1 g/L); óleo de oliva (0,5 mL/L); pH=7) utilizando duas temperaturas de incubação (28°C e 37°C), 120 horas, 150 rpm.

As amostras foram coletadas com intervalo de 24 horas e filtradas. O líquido metabólico foi utilizado para a determinação da atividade lipolítica e do pH. A

biomassa foi utilizada para a determinação da cinética de crescimento e extração de lipídeos totais.

2.5 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA

A determinação da biomassa foi feita através de gravimetria. A massa micelial foi lavada e filtrada em papel de filtro, transferidos para a estufa a 50°C para secagem, em seguida transferidos para o dessecador até peso constante.

2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A atividade lipolítica das amostras foram detectadas utilizando a metodologia descrita por Soares et al. (1999). Através da reação de 5 mL de emulsão de óleo de oliva e goma arábica (7%), 2 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M), pH 7,0 e 1 mL do líquido metabólico. A mistura foi agitada em agitador orbital a 82 rpm, 37°C, durante 10 minutos.

A reação foi paralisada através da adição de 10 mL de acetona-etanol-água (1:1:1v/v), para liberação dos ácidos graxos livres presentes na mistura, em seguida foi realizada a titulação com uma solução de KOH (0,04 N) na presença do indicador fenolftaleína. Os ensaios foram realizados em triplicata e a atividade enzimática foi determinada através da seguinte relação: uma unidade da atividade lipolítica (U/mL) é definida como a quantidade da enzima bruta que libera 1 μ mL de ácido graxo por minuto.

Para os cálculos da atividade enzimática da lipase presente na amostra foi utilizando a seguinte equação:

$$AE(U/mL) = \frac{(V_a - V_b) \times N \times 1000}{t \times V_c} \text{ (eq.1)}$$

AE (atividade lipolítica); V_a (volume da amostra titulada/mL); V_b (volume do branco titulado/mL); N (normalidade da solução de KOH (mol/L); t (tempo de reação em minutos) e V_c (volume da amostra utilizada na reação/mL).

2.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE E CONVERSÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA LÁCTEA EM LIPÍDEOS

Após a produção da lipase em meio convencional, foram realizados ensaios de formulação de meios com resíduos da indústria láctea (soro de leite (SL) e resíduo de sorvete (RS), através de um planejamento fatorial 2^2 com 4 repetições no ponto central (Tabela 1).

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial para formulação de meios alternativos

| Variáveis | - 1 | 0 | + 1 |
|-----------|-----|----|-----|
| RS (%) | 15 | 30 | 45 |
| SL (%) | 10 | 20 | 30 |

RS- resíduo de sorvete; SL – Soro de leite

Os frascos foram incubados em um agitador orbital a 150 rpm, a 28°C, por 120 horas. Ao término dos ensaios, a biomassa foi separada do líquido metabólico por centrifugação a 10.000g durante 15 minutos. Com o líquido metabólico foram realizadas determinações da atividade lipolítica e de pH. A biomassa foi utilizada para determinação da curva de crescimento e lipídeos totais.

A análise dos dados e gráficos foi realizada utilizando o software Statistic 7.0, e a significância dos resultados foram testadas ($p \leq 0,05$).

2.8 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS

Os lipídeos totais da biomassa foram extraídos utilizando 1,0 g da biomassa liofilizada que foi submetida à extração com a mistura de solventes: clorofórmio:metanol (2:1 v/v), agitado por 15 minutos e homogeneizado por 24 horas. Em seguida a amostra

foi centrifugada 5000g por 5 minutos, o sobrenadante contendo os lipídeos foi retirado e reservado em frasco. Esse processo foi repetido sucessivamente utilizando a mistura de solventes clorofórmio:metanol na proporção de 1:1 v/v e 1:2 v/v.

Os extratos foram reunidos e evaporados em rotaevaporador e ressuspensos em 2mL de hexano, evaporados com de nitrogênio e mantidos em dessecador até peso constante (MANOCHA et al., 1980).

A percentual de lipídeos totais presentes da biomassa foi determinada pelo método gravimétrico utilizando a seguinte equação:

$$\text{Lipídeos Totais (\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos} \times 100}{\text{biomassa seca (g)}} \quad (\text{eq.2})$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

As características macroscópicas do crescimento radial das colônias crescidas em placas com o meio Agar Czapek autolisado de levedura (CYE), estão apresentados na figura 1. A colônia apresentou um diâmetro de crescimento de 70 mm em 96 horas a 25°C e 37°C de temperatura. Quanto à coloração da colônia, foram observados micélios brancos e flocosos, conídios de cor verde escuro, e de reverso incolor. Os experimentos foram realizados em frascos de vidro com 250 mL de Extrato de Malte. O crescimento da colônia em Extrato de Malte Agar (MEA), observados na figura 2, também apresentou crescimento flocoso, e conídios de cor oliva e reverso da colônia amarelado.

Figura 1. Crescimento radial no meio de (CYE) verso (A) e reverso (B) da placa.

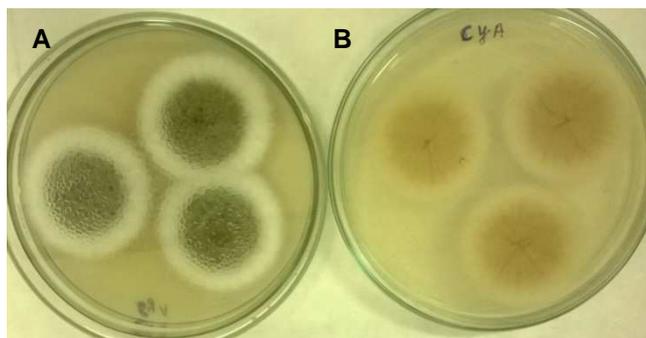
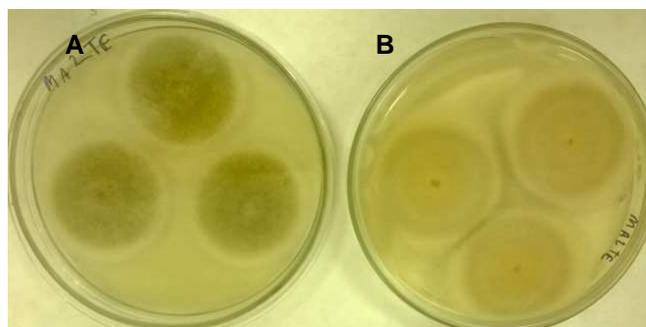


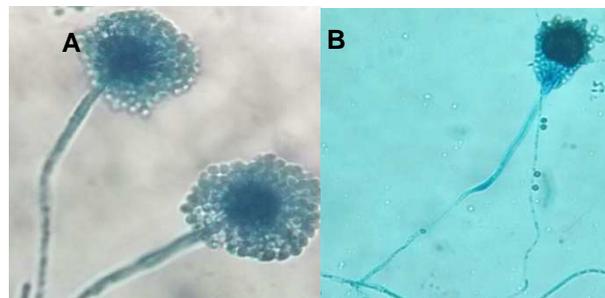
Figura 2. Crescimento radial de *Aspergillus* sp no meio de MEA verso (A) e reverso (B) da placa).



A análise microscópica do crescimento da amostra no meio CYE permitiu a visualização de hifas cabeças do tipo radial, conidióforos de superfície finamente rugosa e incolor, vesículas alcançando entre 30 a 35 μm esféricas a piriformes; predominantemente unisseriado, com pouca bisseriação (métulas e fiálides), diferenciando-se da espécie *Aspergillus flavus*, que apresenta seriação variada, métulas alcançando até 9 μm e fiálides entre 8 a 11 μm de comprimento. Conídios globosos e rugosos entre 3,5 μm a 6 μm de diâmetro, distinguindo da espécie *A. flavus* (KLICH, 2002).

De acordo com identificação clássica, com base nas características macroscópicas e microscópicas, o isolado foi identificado como *Aspergillus parasiticus* (Figura 3).

Figura 3. Micrografia da amostra de *Aspergillus parasiticus* crescida no meio de CYE. A - conidiosporos com conídios globosos e rugoso e B- vesículas com poucas seriação bisseriada métulas e fiálides)

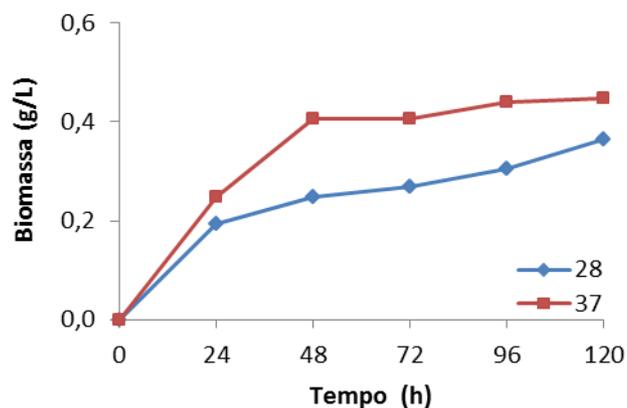


3.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO *A. PARASITICUS*

3.2.1 MEIO PADRÃO

O perfil de crescimento de *A. parasiticus* (SIS 16) para produção de biomassa e atividade lipolítica, (óleo de oliva, a 28°C e 37°C, por 120 horas), estão descritas nas figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4. Perfil de crescimento de *Aspergillus parasiticus*, em 120 h de cultivo em meio padrão nas temperaturas 28 e 37 ° C.



Foi constatado que quando cultivado à temperatura de 37°C, a biomassa produzida foi 23% maior que à 28°C. O pH do meio de cultivo se manteve entre 6,1 a 7,0.

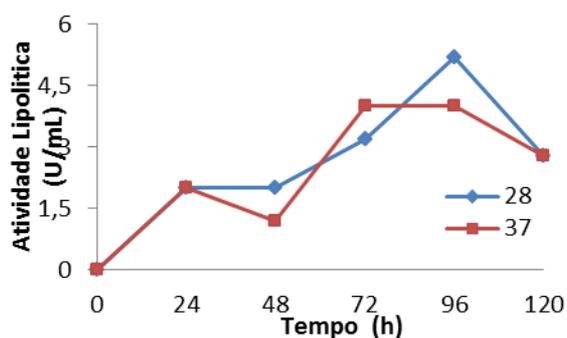
De acordo com Macedo (2009) espécies do gênero *Aspergillus* crescem em pH que varia de 2,0 a 11,0,

assim como a velocidade de crescimento diminui quando o pH afasta-se do ótimo (geralmente próximo a 5,0).

Os resultados da atividade lipolítica de *A. parasiticus* (SIS 16) podem ser observados na figura 5. A maior atividade enzimática foi obtida após 96 horas de cultivo (5,2 U/mL, 28 °C).

As enzimas produzidas por bactérias e fungos têm sido utilizadas no biotratamento de efluentes de diversas origens. Espécies do gênero *Aspergillus* são conhecidamente produtoras de lipases e têm sido estudadas para diferentes aplicações. Por exemplo, na degradação de resíduos resultantes de variados processos industriais como produção de óleo, biodiesel, alimentos, etc. (CAMMAROTA et al., 2006; CONTESINI et al., 2010; TUDORACHE et al., 2012; COLLA et al. 2014; DEVI; SIVAKUMAR, 2014; DOBREV et al., 2014; LAACHARI et al., 2015; NAZ; JADHAV, 2015).

Figura 5. Perfil atividade lipolítica de *A. parasiticus* (SIS 16), em 120 horas de cultivo em meio padrão nas temperaturas 28 e 37 ° C.



3.2.2 MEIOS CONTENDO RESÍDUOS LÁCTEOS

Os resultados (biomassa, atividade lipolítica e lipídeos totais) obtidos nos ensaios com a amostra de *A. parasiticus* (SIS 16), nos meios formulados com soro de leite e resíduo de sorvete, através de um planejamento fatorial 2², com estão descritos na tabela 2.

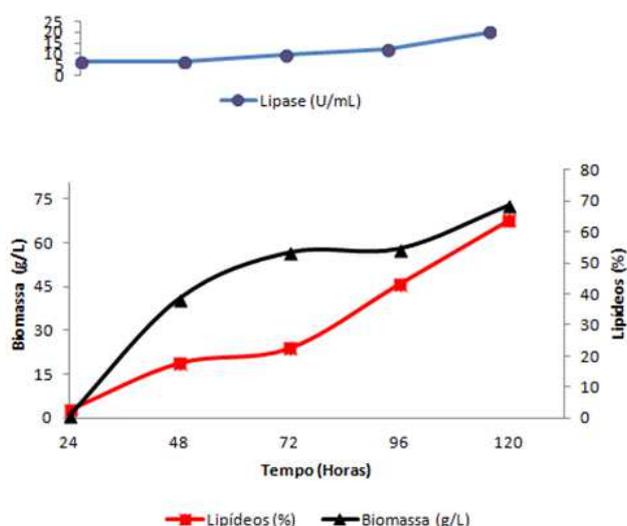
Tabela 2. Produção de biomassa (g/L), AE - atividade lipolítica (U/mL) e lipídeos totais (%), obtidos através do planejamento fatorial 2², em 120 horas de cultivo.

| Ensaio | Biomassa (g/L) | AE (U/ mL) | Lipídeos totais (%) |
|----------|----------------|-------------|---------------------|
| 1 | 3,9 | 4,0 | 9,65 |
| 2 | 37,1 | 4,0 | 5,35 |
| 3 | 50,9 | 4,0 | 36,23 |
| 4 | 68,1 | 20,0 | 67,61 |
| 5 | 53,6 | 5,0 | 34,45 |
| 6 | 53,5 | 5,2 | 34,14 |
| 7 | 54,7 | 5,0 | 33,79 |
| 8 | 54,5 | 5,6 | 33,87 |

Matriz decodificada

A melhor condição foi no ensaio 4 (45% de resíduo de sorvete e 30% de soro de leite), apresentando maior produção de biomassa (68,1 g/L), atividade lipolítica (20,0 U/mL) e de lipídeos totais (67,61%), (figura6). O pH variou na faixa de 6,1 a 7,6, permanecendo próximo da neutralidade.

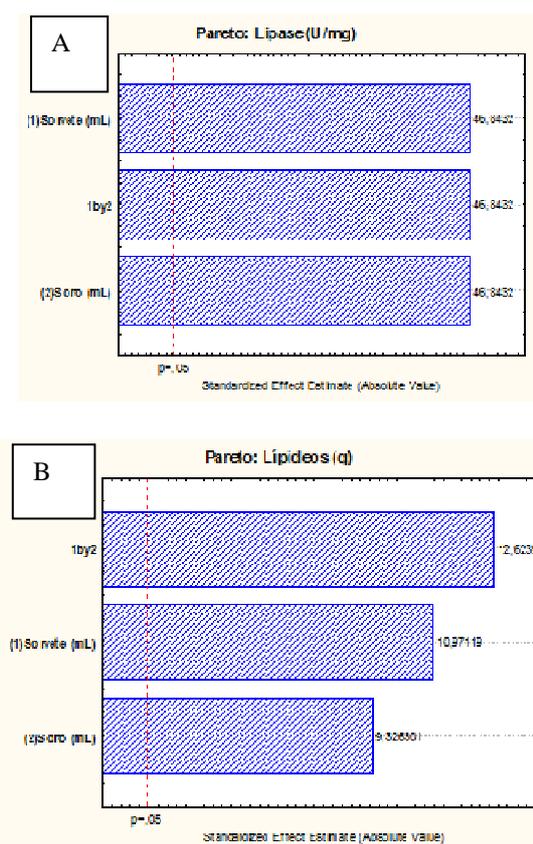
Figura 6. Curva de crescimento (biomassa), lipídeos totais e determinação da atividade lipolítica de *A. parasiticus* (SIS 16), cultivada em meios compostos de resíduos da indústria de laticínios (soro de leite e resíduo de sorvete), através de um planejamento fatorial 2².



Esse resultado representa um percentual superior a 74% da atividade lipolítica em relação ao meio padrão, demonstrando que a introdução dos resíduos (soro de leite e resíduo de sorvete) na composição do meio, estimulam a produção e atividade enzimática.

Na figura 7 estão os diagramas de Pareto relacionados com a produção de lipase (fig. 7A) e a produção de lipídeos (fig. 7B). Os resultados obtidos mostram a significância dos resultados com 95% de confiança representada pela linha tracejada que corresponde a $p = 0,05$, confirmando os resultados obtidos na Tabela 2.

Figura 7. Diagrama de Pareto: A- Produção de lipase e B - Produção de lipídeos.



No diagrama de Pareto (fig. 7 A-B, é visível que as variáveis (SL) e (RS) superaram o valor de $p = 0,05$, obtendo assim um nível de confiança de 95%, confirmando que esses valores são estatisticamente

significativos. A interação dos resíduos influenciou positivamente nas variáveis respostas (fig.7B).

Espécies do gênero *Penicillium*, *P. citrinum* e *P. restrictum* apresentam ótima produção de lipase, com baixo custo de produção (SILVA; BRUNO; CASTRO, 2009; CASTILHO et al., 2000). SILVA; BRUNO; CASTRO, (2009), realizaram ensaios de produção de lipases extracelulares com o *A. parasiticus*, e obtiveram uma atividade lipolítica de 69,9(U/mL) após 72 horas de cultivo.

3.3 CONVERSÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA LÁCTEA EM LIPÍDEOS

A porcentagem de lipídeos presentes no meio de resíduo (tempo zero, sem o inoculo) do ensaio 4 e no tempo final da fermentação (120 horas) determinou a % de tratamento.

Os resultados demonstraram que o meio contendo resíduos da indústria láctea apresenta um conteúdo elevado de lipídeos (59,51%), que foi degradado e utilizado como fonte de nutrientes para crescimento e desenvolvimento do fungo, uma vez que ao final do cultivo foi observado que essa porcentagem de lipídeos reduziu para 0%. *A. parasiticus* (SIS 16) converteu o conteúdo do resíduo rico em lipídeos em biomassa com uma porcentagem de 67,81% de lipídeos totais (ensaio 4).

Segundo subhash (2014) a variação na síntese de lipídeos no citoplasma por fungos é principalmente dependente do tipo de modo nutricional seguido pelos fungos à disponibilidade de nutrientes de carbono. *Yarrowia lipolytica* tem sido exaustivamente estudada na produção de lipase e outras moléculas bioativas como biosurfactantes, assim como sua utilização no tratamento e pré-tratamento de resíduos agroindustriais com conversão em biomassa útil (*single cell protein*) e lipase com baixo custo de

produção e de alto valor agregado (De FELICE et al., 2004; PAPANIKOLAOU et al., 2007;).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos constatou-se que o fungo *Aspergillus parasiticus* (SIS 16) isolado solo da Caatinga do Estado de Pernambuco, demonstrou um elevado potencial biotecnológico para tratamentos de efluentes gordurosos das indústrias lácteas, considerando a produção da lipase, assim como, a conversão desses resíduos em lipídeos, que podem ser utilizados em diferentes setores industriais.

O uso de resíduos da agroindústria, como da indústria láctea, na formulação de meios alternativos tem gerado resultados promissores, uma vez que esses resíduos são ricos em nutrientes que auxiliam na produção de diversos compostos bioativos e podem ser encontrados em grande quantidade. A utilização de planejamento fatorial para obtenção das melhores condições de produção favorece e facilita os estudos envolvendo a conversão nesses metabólitos secundários nos processos de utilização de resíduos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Projeto SISBIOTA-CNPq, FACEPE, CAPES e a UNICAP, pelo suporte financeiro para realização desse trabalho, e ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pela infraestrutura da execução de toda parte experimental.

REFERÊNCIAS

ABU-ELREESH, G. et al. An effective lipid-producing fungal sp. strain DGB1 and its use for biodiesel production. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 34, p. 5347-5353, 2013.

ABU-ELREESH, G.; ABD-EL-HALEEM, D. Promising oleaginous filamentous fungi as biodiesel feed stocks: Screening and identification. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 1, p. 576-582, 2014.

AGGELOPOULOS, T. et al. Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. **Food chemistry**, v. 145, p. 710-716, 2014.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Biosci.** Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

BABU, Meera et al. Production of Single Cell Protein using *Kluyveromyces marxianus* isolated from paneer whey. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 5, n. 5, p. 255-257, 2014.

BARROS, R. P. Diversidade de fungos em um vertissolo com adição de vinhaça na cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). **Revista Uniabeu, Alagoas**, v. 5, n. 10, p.181-195, 2012.

BHANJA, Anshuman et al. Comparative Studies of Oleaginous Fungal Strains (*Mucor circinelloides* and *Trichoderma reesei*) for Effective Wastewater Treatment and Bio-Oil Production. **Biotechnology research international**, v. 2014, 2014.

BRANDELLI, A; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products, **Food Research International** (2015),<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.015>.

CAMMAROTA, Magali C. et al. The effect of enzymatic pre-hydrolysis of dairy wastewater on the granular and immobilized microbial community in anaerobic bioreactors. **Environmental Technology**, v. 34, n. 4, p. 417-428, 2013.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 22-24, 2003

CASTILHO, L. R. et al. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CASTRO, B M. et al. Cholesterol-rich Fluid Membranes Solubilize Ceramide Domains Implications for the structure and dynamics of mammalian intracellular and plasma membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 34, p. 22978-22987, 2009.

- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificações de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipase**. 206f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Minas Gerais, Minas Gerais, 2006.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista de ciências exatas aplicadas e tecnológicas**, v.4, n.2. p.1-14, 2012.
- CONTESINI, F. J. et al. *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3, p. 163-171, 2010.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
- COSTA, P. A. et al. Changes in soil pore network in response to twenty-three years of irrigation in a tropical semiarid pasture from northeast Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 137, p. 23–32, 2014.
- DAMASCENO, F. R. C; CAMMAROTA, M.i C.; FREIRE, D. M. G. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 241-246, 2012.
- DARVISHI, Parviz et al. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 292-300, 2011.
- DEVI, S.; SIVAKUMAR, T. Production and characterization of alkaline lipase from *Aspergillus awamori*. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci**, v. 1, n. 8, p. 212-228, 2014.
- DIAB, Ali; DIN, S. G. E. Production and characterization of biosurfactants produced by *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. isolated from the rhizosphere soil of an egyptian salt marsh plant. **Nat. Sci**, v. 11, p. 103, 2013.
- DOBREV, G. et al. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.77-82, 2014.
- DUMORE, Nilesh S.; MUKHOPADHYAY, Mausumi. Removal of oil and grease using immobilized triacylglycerin lipase. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 68, p. 65-70, 2012.
- GASPARIN, F. G. M. et al. Produção de Lipase e Biossurfactante por Isolado de Efluente de Laticínio. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 28-31, 2012.
- GOPINATH, S. C. B. et al. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed research international**, ID154549, p.1-10, 2013.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HOSSEINPOUR, M. N. et al. Lipase production in solid state fermentation using *Aspergillus niger*. Response surface methodology. **International Journal of Engineering**, v. 25, n. 3, p. 151-159, 2012.
- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.
- JOSHI, V. K.; WALIA, A.; RANA, N. S. Production of Bioethanol from Food Industry Waste: Microbiology, Biochemistry and Technology. In: **Biomass Conversion**, p. 251-311, 2012.
- KIYUKINA, M.S; IVSHINA, I. B; PHILP, J.C; CHRISTOLI, N; DUNBAR, S.A; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal microbiological methods**, 46: 109-120, 2001.
- Klich, M.A. Identification of common *Aspergillus* species. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002, 116p.
- KOKALIS-BURELLE, N. et al. Compendium of peanut diseases. 2^a Ed. St. Paul: **The American Phytopathological Society**, 1977.
- LAACHARI, Faouzi et al. Higher tolerance of a novel lipase from *Aspergillus flavus* to the presence of free fatty acids at lipid/water interface. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 9, n. 1, p. 9-17, 2015.

- LEE, Seon-Woo et al. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 720-726, 2004.
- LIMA, B. F. et al. Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da caatinga de Pernambuco. **e-Xacta**, v. 7, n. 1, 2014.
- LIN, C. S. K. et al. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. **Energy & Environmental Science**, v. 6, n. 2, p. 426-464, 2013.
- LIU, C. et al. Response surface optimization of fermentation conditions for producing xylanase by *Aspergillus niger* SL-05. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 703-711, 2008.
- LIU, X. et al. Systematics-guided bioprospecting for bioactive microbial natural products. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 1, p. 55-66, 2012.
- MACEDO, L. N. et al. Estudo da Influência de Variáveis de Processo na Produção de Lipases por Fungo Filamentoso. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 07, 2009, Rio de Janeiro. Anais... Natal RN: Embrapa, 2009. p. 01 - 05.
- MALDONATO, R. R.; MACEDO, G. A.; RODRIGUES, M. I. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.1, p. 108-115, 2014.
- MANOCHA, M. S., SAN-BLAS, G., Centeno, S.1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. J. GEN. MICROBIOL. **Sabouraudia**, v. 117:147-154.
- MARQUES, T. A. et al. Utilization of dairy effluent as alternative fermentation medium for microbial lipase production. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 19, n. 1, p. 9042-9050, 2014.
- MARTINS, V. G; KALIL, S. J; COSTA, J. A. V. Lipases and biosurfactant production by solid state fermentation for utilization in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbons. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008.
- MENDES, A. A. et al. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.
- MONCIARDINI, P. et al. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 209-220, 2014.
- MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- NANGUL, Agam et al. Microorganisms: a marvelous source of single cell proteins. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 15-18, 2013.
- NAZ, S.; JADHAV, S. K. Studies of the Estimation of Lipase Production Capability of Some Fungal Species and their Application in Oil Spillage Degradation. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v. 4, n. 1, p. 2319-7064, 2015.
- NITSCHKE, M.; Pastore, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- NOTARNICOLA, B. et al. Progress in working towards a more sustainable agri-food industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 28, p. 1-8, 2012.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F. Biotechnological approaches for the value addition of whey. **Critical reviews in biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 327-348, 2012.
- PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electron. J. Biotechnol.**, Valparaíso, v. 10, n. 3, jul. 2007.
- PINTO, M. H; MARTINS, R G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.
- Pitt, J.I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. Academic Press, Inc., New York. 1979.
- PLANTE, A. F., STONE, M. M., MCGILL, W. B. The Metabolic Physiology of Soil Microorganisms. **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**, p. 245, Philadelphia, PA. USA. E. Eldor A. Pau. 2014.

Disponível em: <https://books.google.com.br> Acesso em 02. 09 de 2014. ISBN 978-0-12-415955-6.

PLEISSNER, D., et al. Fungal hydrolysis in submerged fermentation for food waste treatment and fermentation feedstock preparation. **Bioresource technology**, v. 158, p. 48-54, 2014.

REIS, AC de S. Clima da caatinga. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 48, n. 2, p. 325-335, 1976.

RITTER, A. C. **Potencial Toxogênico de *Aspergillus Flavus* testados em diferentes meios de condições**. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Departamento de Pós Graduação de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre Rs, 2007.

ROVEDA, M; HEMKEMEIER, M; COLLA, L. M. Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SILVA, G. dos S; BRUNO, L. M; CASTRO, H. F de. Seleção e Imobilização de Fungos Filamentosos Produtores de Lipase Intracelular. **Quim. Nova**, Fortaleza, v. 5, n. 8, p.01-07, ago. 2009.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M.. Overview of fungal lipase: a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

SMRITHI, S. et al. Bioprospecting of Microbes Producing Commercially Useful Products. **PHARMANEST - An International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 6, p. 1419-1426, 2013.

SOARES, C.M.F. CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 77/79, n.2, p. 745-757, 1999.

SUBHASH, G. V; MOHAN, S. V. Lipid accumulation for biodiesel production by oleaginous fungus *Aspergillus awamori*: Influence of critical factors. **Fuel**,

v. 116, p. 509-515, 2014

SUNG, K.; KIM, Ki S.; PARK, S. Enhancing degradation of total petroleum hydrocarbons and uptake of heavy metals in a wetland microcosm planted with *Phragmites communis* by humic acids addition. **International journal of phytoremediation**, v. 15, n. 6, p. 536-549, 2013.

TUDORACHE, M. et al. Efficient bio-conversion of glycerol to glycerol carbonate catalyzed by lipase extracted from *Aspergillus niger*. **Green Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 478-482, 2012.

VADLAMANI, S.; PARCHA, S. R.. Studies on industrially important alkaline protease production from locally isolated superior microbial strain from soil microorganisms. **International Journal of Biotechnology Applications**, v. 3, n. 3, p. 102-105, 2011.

WANDERLEY, M. D; NEVES, Etney; DE ANDRADE, C. J. Aspecto da produção industrial de enzimas. **Rev. Citino (Hestia)**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

WANDERLEY, M.D; NEVES, E; DE ANDRADE, C. J. A DA P; M. H.; Martins, R.G; Costa, J.A.V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v.32, n.8, p. 2104-2108, 2009.

WANG, L. J. et al. Production of bioenergy and bioproducts from food processing wastes: a review. **Transactions of the ASABE**, v. 56, n. 1, p. 217-229, 2013.

ZEN, C. K. et al. INDUÇÃO DA SÍNTESE DE LIPÍDIOS E PROTEÍNAS POR *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC-UPF**, v. 6, n. 2, p. 40-47, 2014.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos Resultados obtidos, foi possível concluir que:

- O micro-organismo intitulado *Aspergillus* SIS 16 foi indentificado com base nas características macroscópicas e microscópicas, como pertence à espécie *Aspergillus parasiticus*;
- Os resultados obtidos usando um meio controle evidenciaram que em 96 h a 28 °C foi obtida uma atividade lipolítica de 5,2 U/mL;
- Os ensaios realizados com os meios alternativos contendo resíduos da indústria de laticínios através de um planejamento fatorial 2², envolvendo curva de crescimento da amostra de *A. parasiticus* (SIS 16), demonstraram que quanto maior a porcentagem dos resíduos, mais havia crescimento da biomassa atingiu valores de 68,4 g/L;
- Nos ensaios realizados, o denominado ensaio 4 foi considerado o mais satisfatório com relação aos demais ensaios com uma atividade lipolítica de 20,0 U/mL;
- *A. parasiticus* (SIS 16) conseguiu converter o conteúdo do resíduo rico em lipídeos em biomassa com uma porcentagem de 67,81% de lipídeos totais (ensaio 4);
- Os ensaios realizados demonstram que o *A. parasiticus* (SIS 16) utilizou os nutrientes existentes nos efluentes removendo os lipídeos presentes, convertendo-os em biomassa, assim como, acumulando lipídeos nas suas células, sugerindo que o biotratamento é possível;
- Esses resultados demonstram a capacidade da utilização de resíduos lácteos como substratos alternativos nos segmentos biotecnológicos, visando minimizar os impactos ambientais bem como as aplicabilidades na biotecnologia em especial a produção de biodiesel.

ANEXO



ISSN: 1984-3151

MODELO DE ARTIGO DA REVISTA E-XACTA

TEMPLATE FOR REVISTA E-XACTA

Magali Maria de Araújo Barroso¹; Autor²; Autor³

- 1 Doutora em Ciências em Engenharia de Sistemas e Computação. COPPE/UFRJ, 1987. Professora do Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH. Belo Horizonte, MG. magali.barroso@prof.unibh.br.
- 2 Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.
- 3 Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.

*RESUMO: Estabelece o modelo de formatação dos artigos a serem submetidos à **Revista e-xacta**, publicada pelo Centro Universitário de Belo Horizonte - UniBH.*

PALAVRAS-CHAVE: Artigo. Formatação. Revista e-xacta.

*ABSTRACT: It establishes the formatting template for the papers to be submitted to **Revista e-xacta**, which is published by UniBH.*

KEYWORDS: Article. Formatting. Revista e-xacta.

1 INTRODUÇÃO

A **e-xacta** é a revista eletrônica do UniBH, registrada no Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia (IBICT) com o ISSN: 1984-3151. O ISSN (*International Standard Serial Number*) é o Número Internacional Normalizado para Publicações Seriadas, conforme (IBICT, 2012). A Revista **e-xacta**, criada em 2008, tem como objetivo divulgar trabalhos relativos às Ciências Exatas e Tecnologia.

O público-alvo deste periódico é composto pela comunidade acadêmica universitária, profissionais das áreas mencionadas ou que delas se servem no exercício de sua atividade fim, além de organizações públicas, privadas e do terceiro setor; todos atentos à incorporação do conhecimento científico-tecnológico

como uma das bases do desenvolvimento social e econômico.

A periodicidade da revista é semestral (julho e dezembro) com edições especiais temáticas, publicadas esporadicamente. A revista utiliza o software livre SEER - Sistema Eletrônico de Editoração de Revistas, desenvolvido pelo IBICT, para construção e gestão de publicações periódicas eletrônicas. Todo o seu acervo tem livre acesso, disponibilizado pelo *site*: www.unibh.br/revistas/exacta/.

As seções da revista, com exceção do Editorial, estão abertas à submissão de trabalhos e participam do processo de avaliação pelos pares no sistema de avaliação anônima (*double blind review*), por pelo menos dois pareceristas.

Os artigos submetidos devem atender aos objetivos da **Revista e-xacta**, serem inéditos, teóricos ou aplicados às diversas áreas do conhecimento. E realizados em universidades, centros de pesquisa e organizações nacionais ou internacionais, a partir de atividades de ensino, pesquisa ou extensão.

Os interessados em enviar contribuições à revista devem acessar o site www.unibh.br/revistas/exacta/ e seguir as instruções contidas nas Normas Editoriais disponíveis na aba Sobre. As submissões são *online* e além do envio do artigo, seguindo o modelo apresentado na edição Atual da revista, os autores devem preencher os metadados. Tratam-se de informações importantes sobre cada um dos autores e da área temática abordada no conteúdo do trabalho científico. Esclarecimentos de dúvidas e informações adicionais podem ser obtidos pelo e-mail: exacta@unibh.br.

As seções subsequentes deste documento se compõem das normas de formatação a serem adotadas, bem como a estruturação básica de um artigo científico. São estabelecidas as formas de inclusão de objetos ilustrativos, necessários para enriquecer e facilitar o entendimento do texto, e esclarecem a necessidade da inserção das citações, bem como a forma em que as mesmas devem ser apresentadas. Além disso, o texto explicita, conforme as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), o formato das referências de documentos frequentemente consultados, cujas informações podem ser complementadas por França e Vasconcellos (2011). As últimas seções descrevem os procedimentos utilizados para a avaliação dos artigos e para a publicação da revista.

2 NORMAS PARA FORMATAÇÃO

A formatação dos artigos submetidos deve obedecer às diretrizes estabelecidas neste documento, que seguem a padronização da ABNT – NBR 6022 (2003) e NBR 14724 (2005). Aconselha-se ao autor a

utilização deste modelo para editar o artigo. As informações sobre a autoria (Nome do autor, Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail) serão excluídas, pela Comissão Editorial, durante o processo de avaliação.

O artigo deve estar salvo no formato Microsoft Word (.doc) contendo de 6 a 20 páginas. A linguagem deve ser clara, gramaticalmente correta e na terceira pessoa do singular.

O alinhamento do texto deve ter formatação justificada, sem cabeçalho, rodapé, notas de pé de página, nem número da página. O formato do papel deve ser A4, com margens superior e inferior de 2,5 cm e margens laterais de 1,5 cm. A fonte do documento é Arial, o tamanho e estilo da fonte dependem da seção em que o texto se insere. Os parágrafos não possuem recuo, têm espaçamento anterior de 0 pt. e, posterior, de 6 pt.. O espaçamento entre linhas é de 1,5, salvo em casos particulares, explicitados na sequência do texto.

Em um artigo científico destacam-se três elementos:

1. Pré-textuais;
2. Textuais;
3. Pós-textuais.

Optou-se por apresentar esses elementos com enumeração de tópicos para que se esclareça tal formatação. Observe-se que os tópicos são separados por ponto-e-vírgula e o último finalizado com ponto. O afastamento dos marcadores é de 0,75 e o texto de 1,25.

2.1 ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

O primeiro elemento do artigo é o título. É expresso em Português e em Inglês, deve ser breve e inspirado no objetivo geral do trabalho, refletindo o conteúdo do

texto. Em títulos não se coloca ponto final. Se houver subtítulo, este deve ser separado do título por dois pontos (:). Essas informações ocupam as linhas iniciais do documento, ao lado da logomarca da revista. Devem estar centralizadas, em negrito e efeito Versalete. O título em português possui tamanho da fonte 16 e, o em inglês, 14.

Há uma linha em branco de 12 pontos entre o título e as informações sobre os autores, com espaçamento entre linhas de 1,5. Os nomes em negrito, centralizados e fonte 12, separados por ponto-e-vírgula e identificados, posteriormente, por sobrescritos em algarismos arábicos. Na sequência, para cada autor, devem-se apresentar as seguintes informações em fonte de tamanho 8: Titulação máxima. Instituição de formação, Ano. Função e Afiliação Institucional. Cidade, Unidade Federativa. E-mail.

Observe-se que uma linha em branco deve separar os dados supracitados da seção seguinte.

O Resumo e as Palavras-chave, editados na margem esquerda, seguidos de dois pontos, são formatados em itálico, fonte de tamanho 10 e espaçamento simples entre linhas. Nos títulos destas seções usa-se o efeito Versalete. Conforme esclarece a ABNT NBR 6028 (2003), é aconselhável que o resumo contenha no máximo 250 palavras e seja editado em um único parágrafo, no qual se ressaltem o objetivo, o método, os resultados e a conclusão do artigo. Ele deve ser expresso na voz ativa, na terceira pessoa do singular. Composto por frases concisas e afirmativas. Devem-se evitar a enumeração de tópicos e a inserção de símbolos e ilustrações. Na linha posterior são discriminadas de três a seis palavras-chave, que representam o conteúdo do documento, sendo utilizadas como chave de busca. São separadas entre si e finalizadas por ponto.

Após uma linha em branco, inserem-se o *Abstract* e *Keywords*, que são a versão em inglês das duas seções anteriores, com a mesma formatação.

2.2 ELEMENTOS TEXTUAIS

São compostos pela Introdução, Desenvolvimento e Conclusão.

Como pode ser observado, existem linhas em branco e um traço separando a última seção dos elementos pré-textuais para a Introdução, que é a primeira seção dos elementos textuais. A partir desse ponto o texto é formatado em duas colunas de 8,6 cm de largura e espaçamento entre colunas de 0,8 cm.

Na Introdução expõe-se o tema tratado, sua delimitação e foco de abordagem, contextualizando-o na literatura consultada. Apresentam-se o objetivo geral e, os específicos, conceituações, justificativa e motivação do estudo, um breve relato sobre o plano de desenvolvimento, enfim, os pressupostos necessários à sua compreensão. No último parágrafo da Introdução deve constar uma descrição sintética, ou seja, a sinopse do conteúdo abordado nas seções subsequentes do artigo.

O Desenvolvimento é o elemento textual central, a parte principal do artigo. É ele que dá a visão pormenorizada do tema estudado. Pode ser exposto em várias seções tais como: a revisão bibliográfica, o marco teórico que fundamenta a metodologia utilizada, o conjunto de técnicas e processos da pesquisa, a coleta de dados e sua quantificação, se for o caso, além da apresentação e discussão dos resultados.

Apresenta-se na última seção, a Conclusão, a síntese do que foi estudado, onde se devem evidenciar os aspectos essenciais da pesquisa, relacionar os resultados obtidos com os objetivos propostos, expor as dificuldades encontradas, recomendar, se conveniente, novas abordagens para o tema e sua extensão em estudos futuros.

Quanto à formatação, os títulos das seções e subseções, com alinhamento à esquerda, são destacados do texto por uma linha em branco, anterior. Devem ser numerados com algarismos arábicos e com apenas um espaço entre o algarismo e o título, conforme a norma ABNT NBR 6024 (2003). Todos os títulos possuem fonte 12, com efeito Versalete e em negrito. Para facilitar, cada vez que se abrir uma nova seção, copie e cole o título da anterior para depois editá-lo.

As seções podem ter subseções e estas ainda comportam mais três níveis de subdivisões. Como exemplo: **4.2.3 METODOLOGIA** designa a terceira subdivisão da segunda subseção da seção 4.

O autor deve estar atento ao uso de siglas. Na primeira utilização de uma sigla, deve-se informar o seu significado. Na primeira seção deste documento foi mencionada a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT – e, posteriormente foi usada simplesmente a sigla ABNT, já que era conhecido o seu significado. Outra observação importante é que palavras em outros idiomas devem vir em itálico.

Em relação à formatação do artigo, deve-se cuidar para que o título de uma seção ou subseção não ocupe a última linha de uma coluna. Neste caso, linhas em branco são providenciais para que o mesmo ocupe a primeira linha da coluna seguinte.

2.3 ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS

Os Elementos Pós-Textuais não são numerados e se compõem de: Agradecimentos (opcional), Referências, Apêndices (opcional) e Anexos (opcional).

As referências são obrigatórias em um texto científico. A seção 5 deste modelo contém informações mais detalhadas sobre as referências.

Os apêndices e anexos, conforme consta na ABNT NBR 6022 (2003), são textos ou documentos que

ilustram, comprovam, fundamentam ou completam a argumentação do trabalho desenvolvido. A diferença entre eles é que os apêndices são de autoria do próprio autor do artigo e, os anexos, de autoria de terceiros. Para identificá-los, utilizam-se letras maiúsculas consecutivas, seguidas de travessão e do título. Somente as palavras Apêndice e Anexo em caixa alta. As letras de identificação e os títulos devem estar em fonte tamanho 12, em negrito e efeito Versalete, como nos exemplos: **APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO** ou **ANEXO D – MAPA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE.**

3 COMO TRATAR AS ILUSTRAÇÕES

As ilustrações (desenhos, esquemas, figuras, fluxogramas, fotografias, gráficos, mapas, organogramas, plantas arquitetônicas, quadros, entre outras), as equações, as fórmulas, as tabelas e os algoritmos são utilizados com o objetivo de explicar e facilitar o entendimento do texto.

Tais elementos devem ser referenciados no texto e, conforme ensinam França e Vasconcellos (2011), eles devem estar tão próximos quanto possível da primeira vez que forem mencionados. Devem ter numeração sequencial, em separado para cada categoria, seguidos do título e espaçamento simples entre linhas. Devem-se evitar dividir tabelas, algoritmos, quadros, etc. Caso tenham sido extraídos de um documento, já publicado, é obrigatória a indicação do mesmo, logo abaixo do título, deve-se inserir: Fonte – SOBRENOME-DO-AUTOR, ano, p. número-da-página. Antes e após a ilustração deve-se deixar uma linha em branco para destacá-la do texto.

3.1 FIGURAS

As figuras devem ser incluídas e referenciadas como a FIG. 1.



Figura 1 – Logo da **Revista e-xacta** do Centro Universitário de Belo Horizonte
Fonte - GUIMARÃES, 2008, p.3.

Observe-se que o título da figura e, se for o caso, a fonte bibliográfica de onde foi extraída são centralizados e estão inseridos posteriormente à mesma.

3.2 ALGORITMOS

Devem ser formatados como o Algoritmo 1, dado a seguir, com título e espaçamento simples entre linhas.

Algoritmo 1 – Determina e imprime o menor entre dois números distintos.

Algoritmo

declare A,B, Menor numérico

leia A,B

se A < B

então Menor ← A

senão Menor ← B

fim se

imprima Menor

fim algoritmo.

3.3 EQUAÇÕES E FÓRMULAS

Equações e fórmulas devem ser numeradas e citadas no texto conforme a Eq. 1:

$$f = \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

onde: f = frequência [Hz], c = velocidade da luz no vácuo = 3.10^8 [m/s], λ = comprimento de onda [m].

3.4 TABELAS

As tabelas são formatadas segundo a TAB. 1. Observe-se que a numeração e os títulos das tabelas são centralizados e colocados antes das mesmas.

Tabela 1

Parâmetros montagem das Medições

| Medição | f | h_r |
|---------|---------|----------|
| 1 | 200MHz | 75 cm |
| 2 | 400MHz | 33,33 cm |
| 3 | 900MHz | 16,67 cm |
| 4 | 1800MHz | 8,33 cm |

Fonte - GUIMARÃES, 2008, p.2.

4 A IMPRESCINDIBILIDADE DAS CITAÇÕES

Como esclarecem França e Vasconcellos (2011): “A fonte de onde foi extraída a informação deve ser citada obrigatoriamente, respeitando desta forma os direitos autorais.” É, portanto, imprescindível que o autor cite as fontes bibliográficas que nortearam suas ideias no desenvolvimento do trabalho. São elas que dão credibilidade à argumentação, ao emprego da metodologia utilizada para a obtenção dos resultados da pesquisa.

As citações podem ser diretas ou indiretas, como determina a norma ABNT NBR 10520 (2002). As citações diretas são transcritas como aparecem no texto original. Se possuírem até três linhas são editadas no corpo do texto, entre aspas. Observe-se a citação apresentada na parte inicial desta seção. Aquelas que excedem este valor são destacadas como a que se encontra a seguir.

As citações longas, com mais de três linhas, devem constituir um parágrafo independente, com recuo de 1,25, fonte de tamanho 9 e espaçamento simples entre linhas. As aspas são desnecessárias,

já que a formatação diferenciada induz tratar-se de uma citação direta. Ao final deve-se colocar entre parênteses o sobrenome do autor em caixa alta, seguido de vírgula, o ano de publicação e, se possível, o número da página. (SOBRENOME-DO-AUTOR, ano, p. X).

As citações indiretas são livres, isto é, reproduzem as ideias do autor consultado com outras palavras, como consta em (MICHEL, 2005, p.127).

As normas da ABNT estabelecem formas diferentes para a indicação dos autores nas citações, como podem ser vistas em França e Vasconcellos (2011) ou (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

Observe-se que as duas citações do parágrafo anterior são apresentadas de maneiras diferentes. A primeira com apenas o ano entre parênteses e, nesse caso, os sobrenomes dos autores, com as letras iniciais maiúsculas, são separados por vírgulas e a conjunção aditiva “e”. Na segunda, todos os sobrenomes dos autores são editados em caixa alta, separados por ponto-e-vírgula, sendo o último seguido de vírgula e o ano de publicação. Pode-se inserir após o ano, a página de onde foi extraída a informação citada. Caso o documento possua mais de três autores, deve-se indicar na citação, como também em seu registro nas Referências, o sobrenome do primeiro autor acompanhado da expressão latina *et al.*, em itálico, seguida de vírgula e o ano de publicação. Como o exemplo a seguir: Sobrenome-do-primeiro-autor *et al.* (ano) ou (SOBRENOME-DO-PRIMEIRO-AUTOR *et al.*, ano).

5 NORMAS PARA AS REFERÊNCIAS

As referências, separadas por um traço das seções anteriores, são apresentadas ao final do artigo. Elas são obrigatórias em um artigo científico e devem ser composta pelas fontes efetivamente consultadas. Além disso, todo documento pertencente às referências deve ser citado no texto e vice-versa, toda

citação deve ter seu documento fonte presente nas referências.

A lista dos títulos bibliográficos deve estar em ordem alfabética usando o sobrenome dos autores como primeiro parâmetro e, como segundo, o título da publicação. A transcrição dos elementos que compõem as referências deve estar de acordo com as normas da ABNT, especificadas em (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011).

A norma ABNT NBR 6023 (2002) define que as referências devem ser alinhadas à margem esquerda do texto, editadas com espaçamento simples entre linhas, sem afastamento anterior e posterior entre parágrafos. Para destacá-las, elas são separadas por uma linha em branco.

O formato das referências depende do tipo de documento consultado, sendo os principais apresentados nas subseções dadas a seguir, cujas informações, em sua maioria, foram extraídas de (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2011). Alguns códigos devem ser observados. Quando estiver escrito:

- AUTOR – Deve-se escrever o Sobrenome do primeiro autor em caixa alta, seguido de vírgula, e demais nomes deste autor, apenas com as primeiras letras em caixa alta ou as iniciais seguidas de ponto e um espaço entre elas. Caso haja de dois a três autores, coloca-se entre eles um ponto e vírgula e repete-se a formatação apresentada para cada um deles. Se houver mais de três autores coloca-se apenas as informações sobre o primeiro e em seguida, em itálico, a expressão latina *et al.*
- *Informação* – deve-se colocar a informação em itálico.
- Informação – Deve-se colocar a informação com a fonte em estilo normal.
- (Informação) – Deve-se colocar a informação entre parênteses.

- <Informação> - Deve-se apresentar a informação entre os símbolos <>.
- Informação. – Deve-se colocar após a informação um ponto final.
- Cidade: Editora, Ano. – Deve-se colocar a cidade na qual o documento foi publicado, seguida de dois pontos, a editora, seguida de vírgula e o ano de publicação, seguido de ponto final.
- Edição – Deve-se indicar o número da edição do livro, seguida de ponto e depois de um espaço coloca-se ed., a abreviatura de edição.
- Acesso em: 25 dez. 2000. Indica a data em que um documento *online* foi acessado. A expressão Acesso em, seguida de dois pontos, um espaço. o dia da consulta, mais um espaço, seguido da abreviatura do mês e depois de um espaço o ano, seguido de ponto. As abreviaturas dos meses são: jan., fev., mar., abr., maio, jun., jul., ago., set., out., nov. e dez.

5.1 LIVROS

Impresso

AUTOR. *Título*: subtítulo. Edição. Cidade: Editora, Ano. Número de páginas p. ISBN número do ISBN.

Eletrônico

AUTOR. *Título*: subtítulo. Edição. Cidade: Editora, Ano. (disquete, ou CD-ROM) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISBN número do ISBN.

5.2 CAPÍTULO DE LIVRO

Impresso

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. *Título*: subtítulo do livro. Edição. Cidade: Editora, Ano. Capítulo n.º do capítulo. página inicial – página final do capítulo. ISBN número do ISBN.

Eletrônico

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. *Título*: subtítulo do livro. Edição. Cidade: Editora, Ano. (disquete, ou CD-ROM) ou Disponível

em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISBN número do ISBN.

5.3 ARTIGO DE PERIÓDICO

Impresso

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do periódico*, Cidade, v. número do volume, n. número do fascículo, página inicial – página final, abreviatura do mês Ano. ISSN número do ISSN do periódico.

Eletrônico

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do periódico*, Cidade, v. número do volume, n. número do fascículo, página inicial – página final, abreviatura do mês Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano. ISSN número do ISSN do periódico.

5.4 ARTIGO DE JORNAL

Impresso

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do jornal*, Cidade, dia, abreviatura do mês Ano. Número ou Título do caderno, seção ou suplemento, página inicial – página final.

Eletrônico

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. *Título do jornal*, Cidade, dia, abreviatura do mês Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.5 TRABALHOS ACADÊMICOS – MONOGRAFIAS, DISSERTAÇÕES E TESES

Impresso

AUTOR. *Título*: subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas f. Categoria do Trabalho Acadêmico (Área de Concentração) – Nome da Escola ou Instituto, Nome da Instituição Universitária, Cidade, Ano da defesa.

Eletrônico

AUTOR. *Título*: subtítulo. Ano de apresentação. Número de folhas f. Categoria do Trabalho Acadêmico (Área de Concentração) – Nome da Escola ou Instituto, Nome da Instituição Universitária, Cidade,

Ano da defesa. (CD-ROM ou disquete) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.6 TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

Impresso

AUTOR DO TRABALHO. Título: subtítulo. In: NOME DO EVENTO, número, ano, cidade de realização. *Título da publicação*: subtítulo. Ano de apresentação. Cidade da publicação: Editora, Ano. Página inicial – página final do trabalho.

Eletrônico

AUTOR DO TRABALHO. Título: subtítulo. In: NOME DO EVENTO, número, ano, cidade de realização. *Título da publicação*: subtítulo. Ano de apresentação. Cidade da publicação: Editora, Ano. Página inicial – página final do trabalho. (CR-ROM ou disquete) ou Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.7 SITES

NOME DO SITE. *Título do serviço ou produto*. Cidade: Entidade, Ano. Disponível em <endereço eletrônico do site>. Acesso em: dia abreviatura do mês Ano.

5.8 LEIS E RESOLUÇÕES

NOME DO PAÍS, ESTADO MUNICÍPIO OU NOME DA ENTIDADE. Órgão. *Título*. Tipo de documento, Numeração. Dia de mês de ano. Elementos Complementares que identificam o documento. Dados de publicação do documento. Cidade, data.

6 PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO ARTIGO

Após a submissão do artigo, inicia-se o processo de avaliação, que utiliza o sistema de revisão anônima por pelo menos dois pareceristas ou *double blind review*. É criada uma versão do arquivo em formato PDF (*Portable Document Format*), do qual se extraem as informações que identificam sua autoria. Em seguida o artigo é enviado a dois pareceristas. Caso os pareceres sejam conflitantes, um terceiro revisor é acionado para que a Comissão Editorial tenha o aval

duplo de aceitação ou rejeição. Os pareceres quando recebidos são, também, formatados em PDF e enviados aos autores, sem a identificação de quem emitiu o parecer.

Sendo o artigo aceito para a publicação com restrição, os autores devem acatar as recomendações dos pareceristas e providenciarem o envio da nova versão do artigo.

Após a correção, a Comissão Editorial insere o nome do autor, enumera as páginas e demais dados pertinentes ao periódico, contendo informações sobre a edição da revista (volume, número, páginas etc.).

Deve-se ressaltar que o artigo (originalidade, autoria, conteúdo abordado etc.) é de inteira responsabilidade do autor, assim como a apresentação do texto no padrão culto da língua. A Comissão Editorial se dá o direito de alterar a formatação e a linguagem do texto para ajustá-las ao padrão da revista.

7 PUBLICAÇÃO

A última etapa do processo editorial é a publicação da revista. A nova edição é disponibilizada com o Sumário, que elenca os títulos dos artigos, os respectivos autores e o link para o Resumo. Ao acessar o Resumo, o usuário pode baixar o artigo completo no formato PDF.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece ao Diretor, aos Coordenadores e Professores dos cursos do Instituto de Engenharia e Tecnologia e à Administração Superior do UniBH pela confiança e apoio.

Agradece, especialmente, ao Prof. Cayley Guimarães, editor pioneiro da e-xacta, e aos editores das demais revistas eletrônicas do UniBH: Ana Sofia Sauma

(e-civitas), Luciene dos Santos (e-com), Ana Cristina Pereira Lage (e-hum) e Thiago Teixeira Mendes (e-scientia), companheiros de objetivo e trabalho.

REFERÊNCIAS

ABNT - NBR 6022: **Informação e documentação – Artigo em publicação periódica científica impressa - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2003. 5 p.

ABNT - NBR 6023: **Informação e documentação - Referências – Elaboração.** Rio de Janeiro, ago. 2002. 24 p.

ABNT - NBR 6024: **Informação e documentação - Numeração progressiva das seções de um documento escrito - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2003. 3p.

ABNT - NBR 6028: **Informação e documentação - Resumo - Apresentação.** Rio de Janeiro, nov. 2003. 2 p.

ABNT - NBR 10520: **Informação e documentação - Citações em documentos – Apresentação.** Rio de Janeiro, ago. 2002. 7 p.

ABNT - NBR 14724: **Informação e documentação - Trabalhos Acadêmicos - Apresentação.** Rio de Janeiro, maio 2005. 9 p.

FRANÇA, J. L.; VASCONCELLOS, A. C.; **Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas.** 8.^a ed. rev. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2011. 358 p. ISBN: 978-85-7041-560-8.

GUIMARÃES, C. ModeloexactaWord. **Revista e- xacta.** Belo Horizonte, Uni-BH, 2008. 3 p.

IBICT – Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia. Centro Brasileiro do ISSN. **Sobre o ISSN.** Brasília,DF: IBICT, 2012. Disponível em <http://www.ibict.br/informacao-para-ciencia-tecnologia-e-inovacao%20centro-brasileiro-do-issn>. Acesso em: 11 abr. 2012.

MICHEL, M. H. **Metodologia de Pesquisa Científica em Ciências Sociais.** São Paulo: Editora Atlas S.A., 2005. 141 p. ISBN: 85-224-4053-0.