



Fermentação microbiana de resíduos graxos de suínos como processo alternativo para produção de biodiesel

Roger Vasques MARQUES¹, Lucas Lourenço Castiglioni GUIDONI², Eduarda Hallal DUVAL³, Érico Kunde CORRÊA⁴

¹Universidade Federal de Pelotas (rrogermarques@ibest.com.br)

²Universidade Federal de Pelotas (lucaslcg@gmail.com)

³Universidade Federal de Pelotas (eduardahd@hotmail.com)

⁴Universidade Federal de Pelotas (ericokundecorrea@yahoo.com.br)

Resumo

A Política Nacional de Resíduos Sólidos regulamenta que resíduos sólidos devem ser preferencialmente reaproveitados, reciclados ou tratados e nesse sentido, é desejada a valorização desses resíduos, principalmente aqueles de alto impacto e/ou volume, como é o caso dos abatedouros de suínos. Nesse intuito, este trabalho teve por objetivo reduzir o ponto de fusão de resíduos graxos suínos a fim de melhorar suas características para produção de biodiesel. Foram analisadas previamente à fermentação o teor de umidade e acidez livre dos resíduos. As gorduras foram submetidas a fermentação por *Staphylococcus xylosus* em cinco tempos de fermentação (1,5 a 7,5h) e em cinco concentrações de gorduras diferentes (2 a 10%). A maior redução de temperatura foi de aproximadamente 24°C e foi observada em 4,5h de fermentação sem diferença significativa entre todas as concentrações testadas ($p < 0,05$). As sucessivas camadas membranosas dos resíduos graxos dificulta o ataque microbiano nas gorduras, o que causa um comportamento irregular de mudança do ponto de fusão ao longo.

Palavras-chave: Resíduo graxo, Lipase, Biocombustível

Área Temática: Resíduos Sólidos.

Microbial fermentation of pork fatty waste as an alternative process for biodiesel production

Abstract

*The National Policy of Solids Waste regulates that solid waste should preferably be reused, recycled or treated and in this sense, is desired recovery of such wastes, especially those of high impact and/or volume, as is the case of pig slaughterhouses. To that end, this study aimed to reduce the melting point of fatty pig waste to improve its characteristics for biodiesel production. Were analyzed prior to fermentation moisture content and free acid content of the waste. The fats were subjected to fermentation by *Staphylococcus xylosus* during several times of fermentation (1.5 to 7.5h) and five different concentrations of fat (2 to 10%). The greatest reduction temperature was approximately 24°C at 4.5h of fermentation with no significant difference between all concentrations tested ($p < 0.05$). Successive membranous layers in the fatty waste complicates the microbial attack on the fats, which causes an erratic behavior change to melting point.*

Key words: Fatty waste, Lipase, Biofuel

Theme Area: Solid waste



1 Introdução

Dentre as carnes mais consumidas no mundo, a de suínos está no topo da lista. Produzida principalmente pela China, União Européia, Estados Unidos, Brasil e Rússia, ela é um importante componente da alimentação humana tanto pelos seus aspectos nutricionais, socioeconômicos e culturais. Nosso país ocupa a quarta colocação no ranking mundial de produção. As perspectivas para 2013 apontam uma produção de 3,4 milhões de toneladas de carne de porco, o país ainda abastece toda sua demanda interna e ainda exporta cerca de 20% do montante produzido anualmente (BRASIL, 2013).

Em contraponto, o aumento da produção também faz os resíduos gerados convergirem para patamares cada vez maiores e formas de não somente tratamento, mas de valorização desses resíduos devem ser desenvolvidas a fim de reduzir os custos ou ainda incrementar a receita dessas agroindústrias por meio da transformação desses resíduos em uma matéria-prima de produtos de maior valor agregado como pode ser o caso dos resíduos graxos (TRITT & SCHUCHARDT, 1992; MARQUES et al., 2012).

Pela insolubilidade dos resíduos lipídicos nos corpos hídricos, estes se tornam potenciais impactantes ambientais quando dispostos inadequadamente ao meio ambiente (BRASIL, 2010). Desse modo, como uma alternativa para reduzir o impacto ambiental e agregar valor, surge o interesse em transformar este resíduo graxo em biodiesel, contribuindo para alcançar a sustentabilidade do sistema de produção animal (PADULA et al., 2012).

No entanto, como um primeiro contraponto, as gorduras animais se apresentam em estado sólido a temperatura ambiente, elevando o custo de todos os processos envolvidos para seu processamento e tratamento, desde seu transporte que deve ser realizado em temperaturas altas o suficiente para permitir que esses resíduos permaneçam líquidos, evitando entupimento de tubulações e facilitando a transferência de massa bem como futuras reações químicas que envolvam a produção de substratos de maior valor agregado como o caso de biodiesel. (NIGAN & SINGH, 2011).

Pela alta estabilidade desses materiais graxos, a reação de transesterificação que produz ésteres de ácidos graxos (biodiesel) exige o uso de catalisadores a fim de baixar a energia de ativação dos triacilgliceróis, permitindo a síntese. Bem conhecidas, são a catálises ácida, alcalina e enzimática. Desses três tipos de catalisadores, o último tipo se destaca por possuir a capacidade de ser recuperado e reutilizado, reduzindo o volume de resíduos gerados no processo, além de possuir especificidade com seu substrato e causar uma maior queda na energia de ativação da reação, permitindo que ela seja realizada em temperaturas significativamente menores que os demais tipos de catalisadores (OTERA, 1993; SOLOMONS & FRYHLE, 2009).

Apesar dessas vantagens perante os outros catalisadores, o grande revés que impede seu uso extensivo em grandes escalas é que sua forma purificada tem um custo elevado de produção, assim uma alternativa seria o uso direto de micro-organismos que produzissem essa enzima e liberassem no meio, caracterizando um processo fermentativo (HASAN et al., 2006; JAEGER & EGGERT, 2002; MU et al., 2008).

Paralelamente a isso, Fiegler & Brückner (1997) identificaram o gene responsável pela produção de serina acetil transferase (E.C.3.1.1.3), enzima capaz de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 carbonos), em cepas de *Staphylococcus xylosus*, uma bactéria usada para fermentação de carnes pelas suas características proteolíticas e lipolíticas (KOZACINSKI et al., 2008).

Assim, este trabalho teve por objetivo tratar resíduos graxos de abatedouros de suínos através de fermentação microbiana, a fim reduzir seu ponto de fusão através da quebra da cadeia linear de carbonos dos ácidos graxos.



2 Materiais e Métodos

2.1. Coleta de amostras

As amostras dos resíduos graxos foram coletadas em um frigorífico abatedouro da região sul do estado do Rio Grande do Sul, de animais recém abatidos e antes da operação de lavagem das carcaças, dando preferência a gorduras com o menor resquício de sangue possível. Foram retiradas amostras do invólucro graxo dos rins dos animais, com massa aproximada de 0,5kg, a coleta nesse ponto da linha de processamento visou facilitar as futuras operações de limpeza, contribuindo para a homogeneidade das amostras entre si. Os resíduos foram gentilmente doados pela empresa Frigorífico Castro S.A. situada em Pelotas-RS (Latitude: 31° 46' 19" Sul; Longitude: 52° 20' 33" Oeste).

2.2. Teor de umidade e acidez

Para obtenção do teor de umidade dos resíduos graxos frescos de suínos, foram pesadas 5g de gordura animal em cadinhos previamente tarados e levados para estufa a 105°C. Foi realizada a pesagem das amostras em intervalos de 1h a partir da segunda hora sob secagem até a obtenção de peso constante, conforme metodologia indicada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

O teor de acidez livre foi mensurado utilizando adaptação do método KS M ISO 6618 (Korean Standard Association, 2003) para produtos oriundos do petróleo e lubrificantes por método titulométrico. Foram pesadas 5g de resíduo graxo animal em frasco erlenmeyer e adicionados 50 mL de solução de éter etílico/etanol (2:1 v/v) como solvente. Foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% e após 1 h em repouso, a solução foi titulada com KOH 0,1N até o aparecimento e permanência da cor rósea.

O índice de acidez é expresso pela massa de KOH necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes na amostra por g de amostra (mg KOH.g^{-1}). O teor de acidez livre foi calculado de acordo com a Eq. 1 a seguir.

$$A = \frac{5,611 \times a \times F}{S} \quad (1)$$

Onde, “A” é o valor da acidez (mg KOH.g^{-1}), “a” é o volume de KOH consumido na titulação (mL), “F” é a normalidade do hidróxido de potássio, e “S” é a massa de amostra (g).

Ambas as análises visaram averiguar a susceptibilidade inicial dos resíduos ao processo de transesterificação. Atingido um limiar de umidade, a agitação realizada no reator promove a saponificação e consequente formação de sabões, reduzindo o rendimento da produção de biodiesel. Já a presença de ácidos livres, indicativos da decomposição natural dos lipídios, dificulta a purificação do éster e glicerol, também causando quedas de rendimento de combustível (CHEN & LUO, 2011). Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

2.3. Culturas microbianas

Cepas de *Staphylococcus xylosus* foram utilizadas no experimento. Pertencente a família das *Micrococcaceae*, o *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria mesófila, gram-positiva, em aerobiose apresenta crescimento ótimo, podendo ainda ser anaeróbio facultativo, porém com desenvolvimento menos significativo. É amplamente empregado pela indústria de alimentos em produtos fermentados. Esta última característica é conferida devido a sua capacidade de produzir compostos corantes, flavorizantes e de redução de nitratos, a partir da hidrólise de proteínas e lipídios, servindo como uma das culturas iniciadoras, juntamente com bactérias ácido-láticas, no processamento de queijos e produtos cárneos fermentados em geral (CICHOSKI et al., 2011; MANSOUR et al., 2009; OLESEN & STAHNKE, 2004).



2.4. Pré-enriquecimento

Para cada operação, foi preparado um tubo com 10 mL de caldo BHI (HIMEDIA – M210) conforme instrução contida no rótulo, e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Foi transferido assepticamente para esse tubo uma alçada de culturas estoques de *S.xylosus* e incubados em estufa a 35 ± 0,1°C por um *Overnight* de forma a retirar as células do estado de latência (MANSOUR et al., 2009).

Após o período de um *Overnight*, 1L de caldo BHI previamente esterilizado foi inoculado com 10 mL do meio pré-enriquecido (1% v/v) e incubado a 35 ± 0,1°C e 100rpm em câmara incubadora com agitação orbital (shaker). A fim de manter a concentração inicial de células na fermentação constante, foi construída a curva de crescimento bacteriana. Dessa forma foi averiguado que é necessário um tempo de incubação de 3h para atingir a concentração de 10⁸ UFC/mL de meio de cultivo.

Para determinação desse ponto do crescimento onde a concentração celular atinge a ideal, foram transferidos assepticamente 2mL do caldo com as culturas pré-enriquecidas para um erlenmeyer com 200mL de caldo BHI estéril, submetido a fermentação em incubadora shaker a 35 ± 0,1°C e 100rpm ao longo de 8h, conforme metodologia descrita por Mauriello et al. (2004).

No tempo inicial, a partir da primeira hora e em intervalos de 1,5h, foram coletadas amostras do mosto e inoculadas em ágar BHI para contagem de colônias, utilizando a técnica do espalhamento em superfície onde 0,1mL da amostra foi assepticamente transferido para as placas e espalhadas pela superfície com auxílio de alça de Drigalski e incubadas a 35 ± 0,1°C por 24h para realização da contagem de colônias e determinação do tempo de enriquecimento necessário para atingir a concentração desejada de colônias no inóculo.

2.5. Fermentação das gorduras suínas

As amostras de gorduras foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e após adição dos respectivos volumes de caldo BHI, foram levadas a homogeneizador de alimentos tipo “*Stomacher*” por 2 min e transferidas para erlenmeyers estéreis onde o volume total do mosto foi de 200 mL. Os frascos foram dispostos em incubadora “shaker” para início da fermentação, sob 35 ± 0,1°C e 100 rpm. As condições de fermentação obedeceram ao delineamento experimental descrito na Tab. 1 a seguir.

Tabela 1 – Delineamento experimental aplicado na fermentação de gorduras

Resíduo	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes
	Tempo de fermentação (h)	Concentração de gordura (%)	
Gordura suína	1,5	2,0	Ponto de fusão (AOCS, 2009)
	3,0	4,0	
	4,5	6,0	
	6,0	8,0	
	7,5	10,0	

3 amostras x 5 tempos x 10 concentrações = 150 experimentos x 3 repetições = 450 resultados

Ao atingir cada tempo analítico alvo, a fermentação foi interrompida e foi coletada assepticamente uma amostra de aproximadamente 1g de cada erlenmeyer, correspondente as cinco diferentes concentrações em teste, submetendo-as a análise de ponto de fusão.

2.6. Ponto de fusão

A análise do ponto de fusão seguiu metodologia descrita pela American Oil Chemists Society (AOCS, 2009) onde aproximadamente 1g de amostra foi transferida para um tubo de



ensaio e aquecida lentamente em manta térmica desde 30°C até 80°C. São detectadas três temperaturas diferentes ou não, referentes a três ácidos graxos que compõe o triacilglicerol, diferentes ou não. Dessa forma, foi tomado como ponto de fusão a temperatura de pico, ou intermediária, restando somente a fração cristalizada de gordura no tubo de ensaio (RODRIGUEZ-RACT et al., 2010).

2.7. Tratamento estatístico

Os dados experimentais correspondentes aos pontos de fusão foram tabulados, seguido de Análise de Variância (ANOVA). A Diferença Mínima Significativa (DMS) entre as médias dos resultados foram analisadas por teste de Tukey à nível de 5% de significância (MONTGOMERY & RUNGER, 2012).

3 Resultados e Discussão

3.1. Teor de umidade e acidez

A Tabela 2 apresenta os valores de umidade e acidez livre dos resíduos graxos suínos antes da fermentação. A umidade do resíduo foi superior ao limite máximo estabelecido pela literatura de 0,06%, esse fato pode ser explicado pelo fato de que a gordura renal suína apresentou um extensivo invólucro membranoso externo e interno, o que pode ter contribuído para uma maior retenção de água nessa amostra. Segundo Ma et al. (1998), um resíduo lipídico que possua uma umidade superior a 0,06% deve sofrer previamente um processo de remoção desse teor de água, quando a produção de biodiesel for almejada. Já a acidez livre encontrada está de acordo com o limiar máximo estabelecido por Ma et al. (1998) de 1mg KOH.g⁻¹ para gorduras animais destinadas à transesterificação.

Tabela 2 - Propriedades físicas das gorduras animais in natura

Propriedades	Sebo Bovino*	Método
Umidade (%)	0,07 ± 0,012	Secagem em estufa (AOAC, 1995)
Acidez (mg KOH.g ⁻¹)	0,204 ± 0,01	Titulometria (KS M ISO 6618)

*- Média e desvio padrão de três repetições

A partir desses resultados, os resíduos graxos bovinos foram pré-selecionados visando simular uma situação operacional real, sendo que somente após averiguar esses dois parâmetros físico-químicos que eles foram encaminhados para tratamento biológico.

3.2. Ponto de fusão

Os resultados encontrados para os pontos de fusão após o tratamento biológico estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Pontos médios de fusão de gordura suína ao longo da fermentação

Concentração (%)	PF (°C)				
	Tempo de fermentação (h)				
	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
2	65,50 ^{1,a}	54,75 ^{2,a}	42,50 ^{3,a}	46,75 ^{3,a}	57,25 ^{2,a}
4	66,25 ^{1,a}	56,25 ^{2,a}	45,75 ^{3,a}	47,50 ^{3,a}	57,00 ^{2,a}
6	56,50 ^{1,b}	45,50 ^{23,b}	42,00 ^{3,a}	49,50 ^{2,a}	58,25 ^{1,a}
8	61,75 ^{1,ab}	47,00 ^{3,b}	43,25 ^{3,a}	47,00 ^{3,a}	53,75 ^{2,a}
10	58,75 ^{1,ab}	44,00 ^{3,b}	42,50 ^{3,a}	49,75 ^{2,a}	59,50 ^{1,a}

* letras iguais nas colunas e números iguais nas linhas não apresentam diferença significativa, letras diferentes nas colunas e números diferentes nas linhas apresentam diferença significativa ($\alpha = 0,05$). Ponto de fusão inicial de 68°C ± 1,2°C.



Analisando os dados apresentados na Tabela 3, podemos averiguar que houve uma queda do ponto de fusão dos resíduos graxos animais tratados pela fermentação das bactérias. A partir de 3h de processo é evidenciada uma queda significativa no ponto de fusão para todas as concentrações de gordura, sendo intensificada quanto maior o tempo reacional. Quanto às concentrações, foi detectada a maior queda do ponto de fusão em 4,5h sem diferença significativa entre as concentrações testadas. Apesar de que nas concentrações maiores os menores pontos de fusão foram alcançados em menor tempo, a partir do terceiro ponto analisado as temperaturas de fusão já apresentam-se sem diferença significativa entre si em relação as concentrações, o que infere que esse parâmetro não possui relevância no gradiente do ponto de fusão da gordura de suínos.

Outro fator da gordura suína que merece destaque é o fato da temperatura de fusão voltar a se elevar à medida que o tempo de fermentação transcorre, mesmo em concentrações onde o ponto de fusão já havia caído para níveis inferiores a 50°C. A provável explicação são as camadas de membranas sucessivas encontradas na gordura do invólucro renal dos suínos, formando uma barreira a ação do *S.xylosus*. Essa decadência e conseguinte aumento do ponto de fusão sugerem que, uma camada membranosa mais externa foi hidrolisada pelas bactérias, sendo necessário cerca de 2h de reação metabólica para tal quebra ocorrer, e somente assim a cadeia carbonada dos ácidos graxos pode iniciar a ser fracionada (COMA, 2008; COOKSEY, 2005).

O seguinte incremento no ponto de fusão a partir de 6h de fermentação sugere que uma nova camada mais interna de membrana foi encontrada pelas bactérias, cessando a ação direta nos triglicerídeos, forçando-as a adaptarem seu metabolismo e produzir enzimas capazes de hidrolisar as membranas, permitindo novo contato com os triglicerídeos, promulgando seu crescimento no meio (MANSOUR et al., 2005; ZHOU, 2003). Zhou et al. (2012) reportam que mudanças bruscas em condições de operação de processos industriais e laboratoriais envolvendo micro-organismos causam distúrbios em seu metabolismo e atividade fisiológica podendo favorecer ou frear o crescimento microbiano devido ao tempo de adaptação necessário para replicação do DNA e replicação do RNA em novos compostos que permitam a ele se desenvolver. Diante desses resultados, a coleta de gordura suína livre de tecidos membranosos se faz necessária para otimizar a ação das lípases do *S. xylosus*.

4 Conclusão

Concluimos que a fermentação causada por *Staphylococcus xylosus* em gorduras residuais suínas causam uma queda significativa em seus pontos de fusão devido à quebra na cadeia carbonada dos ácidos graxos, entretanto, apesar de a temperatura de fusão ter apresentado uma queda de 24°C, o ponto de coleta dos resíduos deve ser analisado mais profundamente, a fim de identificar resíduos graxos com uma presença menos significativa de membranas entre os tecidos.

5 Referências

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY (AOCS). **AOCS Official Method Cj 1-94**. 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. v.2, n.17. Gaithersburg EUA: AOAC, 1995.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria Recursos Hídricos e Ambiente Urbano. Lei Nº 12.305 de 02 de Agosto de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília, DF, 2010.



BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Estatística de produção pecuária: Setembro de 2013**. Brasília/DF. 2013.

CHEN, Y. H.; LUO, Y. M. *Oxidation stability of biodiesel derived from free fatty acids associated with kinetics of antioxidants*. **Fuel Processing Technology**. v.92, p.1387-1393, 2011.

CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, A. P.; DI LUCCIO, M. *Viability of Staphylococcus xylosus during shelf-life of dulce de leche prepared by vacuum evaporation*. **Ciência Rural**. v.41, n.11, p.2026-2031, 2011.

COOKSEY, K. *Effectiveness of antimicrobial food packaging materials*. **Food Additives and Contaminants**. v.22, p.980-987, 2005.

COMA, V. A review: *Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products*. **Meat Science**. v.78, p.90-103, 2008.

FIEGLER, H.; BRÜCKNER, R. *Identification of the serine acetyltransferase gene of Staphylococcus xylosus*. **FEMS Microbiology Letters**. v.148, p.181-187, 1997.

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

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. *Lipases for biotechnology*. **Current Opinion in Biotechnology**. v.13, n.4, p.390-397, 2002.

KOREAN STANDARD ASSOCIATION. **Petroleum products and lubricant determination of acid or base number: Colour indicator titration method. KS M ISO 6618**. 2003.

KOZACINSKI, L.; DROSINOS, E.; CAKLOVICA, F.; COCOLIN, F.; GASPARIK-REICHARDT, J.; VESKOVIC, S. *Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages*. **Food Technology and Biotechnology**. v.46, p.93-180, 2008.

MA, F. R.; CLEMENTS, L. D.; HANNA, M. A. *The effects of catalyst, free fatty acids, and water content on transesterification of beef tallow*. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**. v.41, p.1261-1264, 1998.

MANSOUR, S.; BAILLY, J.; LANDAUD, S.; MONNET, C.; SARTHOU, A. S.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LEROY, S.; IRLINGER, F.; BONNARME, P. *Investigation of association of Yarrowia lipolytica, Staphylococcus xylosus, and Lactococcus lactis in culture as a first step in microbial interaction analysis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.75, n.20, p.6422-6430, 2009.

MARQUES, R. V.; DA PAZ, M. F.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M.; CORRÊA, L. B.; CORRÊA, E. K. Resíduos Sólidos de Matadouros-Frigoríficos. In: **Gestão de Resíduos**. Porto Alegre: Manas/Evangraf, 2012. p.210-226.



MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. *Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy*. **Meat Science**. v.67, p.149-158, 2004.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 5ª Ed.

MU, Y.; XIAU, Z. L.; ZHANG, D. J. *A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumonia**. **Biochemical Engineering Journal**. v.40, p.537-441, 2008.

NIGAN, P. S.; SINGH, A. *Production of liquid biofuels from renewable resources*. **Progress in Energy and Combustion Science**. v.37, p.52-68, 2011.

OLESEN, P. T.; STAHNKE, L. H. *The influence of environmental parameters on the catabolism of branched-chain amino acids by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus**. **Food Microbiology**. v.21, p.43-50, 2004.

OTERA, J. Transesterification. **Chemical Reviews**. v.93, p.1449-1470, 1993.

PADULA, A. D.; SANTOS, M. S.; FERREIRA, L.; BORENSTEIN, D. *The emergence of the biodiesel industry in Brazil: Current figures and future prospects*. **Energy Policy**. v.44, p.395-405, 2012.

RODRIGUEZ-RACT, J. N.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T. P.; SILVA, R. C.; GIONELLI, L. A. *Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de leite e óleo de girassol*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.30, n.1, p.258-267, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9.ed. v.2. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

TANO-DEBRAH, K.; FUKUYAMA, S.; OTONARI, N.; TANIGUCHI, F.; OGURA, M. *An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils*. **Bioresource Technology**. v.69, n.2, p.133-139, 1999.

TRITT, W. P.; SCHUCHARDT, F. *Materials flow and possibilities of treating liquid and solid wastes from slaughterhouses in Germany. A review*. **Bioresource Technology**. v.41, p.235-245, 1992.

ZHOU, J. *Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis*. **Current Opinion in Microbiology**. v.6, p.288-294, 2003.

ZHOU, Z.; MENG, F.; LIANG, S.; NI, B.; JIA, X.; LI, S.; SONG, Y.; HUANG, G. *Role of microorganism growth phase in the accumulation and characteristics of biomacromolecules (BMM) in a membrane bioreactor*. **RSC Advances**. v.2, p.453-460, 2012.