



## **Hidrólise microbiana de resíduos graxos bovinos: Pré-tratamento para produção de biodiesel**

**Roger Vasques MARQUES<sup>1</sup>, Lucas Lourenço Castiglioni GUIDONI<sup>2</sup>, Gustavo Amaro BITTENCOURT<sup>3</sup>, Eduarda Hallal DUVAL<sup>4</sup>, Érico Kunde CORRÊA<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (rrogermarques@ibest.com.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas (lucaslcg@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas (gustavobittencourt32@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas (eduardahd@hotmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas (ericokundecorrea@yahoo.com.br)

### **Resumo**

A crescente produção carne bovina nacional infere naturalmente em um incremento na geração de resíduos gerados pelas indústrias, dessa forma com a abundância desses materiais, torna-se interessante a busca por novas tecnologias capazes de tratar esses resíduos de tal forma que se tornem uma matéria-prima para produtos de maior valor agregado. Assim, este trabalho teve por objetivo utilizar micro-organismos lipolíticos capazes de hidrolisar resíduos graxos bovinos a fim de torná-los aptos a serem transformados em biodiesel pela redução de seu ponto de fusão a temperaturas mais amenas, possibilitando sua produção com balanço energético positivo.

Palavras-chave: Resíduo graxo, Fermentação, Lipase, Biocombustível

Área Temática: Resíduos Sólidos.

## **Microbial hydrolysis of cattle fatty waste: Pretreatment for biodiesel production**

### **Abstract**

*The rise in the national cattle beef production naturally infers an increase in the generation of waste produced by industries, thus since that these materials are in abundance, it is interesting to search for new technologies capable of treating such waste in a way that they become a raw material for products with higher added value. Thus, this work aimed at using lipolytic micro-organisms capable of hydrolyzing cattle fatty residues in order to make them suitable for processing into biodiesel by reducing its melting point at cooler temperatures, enabling its production with positive energy balance.*

*Key words: Fatty waste, Fermentation, Lipase, Biofuel.*

*Theme Area: Solid waste*



## 1 Introdução

A cadeia nacional de gado de corte produziu em 2012, cerca de 7,4 milhões de toneladas de carne, abastecendo toda a demanda nacional com produção própria e 25% do total produzido ainda é destinado ao mercado internacional, o que é bastante expressivo, pois se estima que em 2020, 44,5% de toda carne bovina consumida no mundo seja proveniente do Brasil (FAO, 2011).

No entanto, atrelado a esta crescente industrialização de carcaças animais, há um proporcional aumento na quantidade de resíduos gerados, que são principalmente ricos em lipídeos e proteínas (PETERLINI, 2012). Para os abatedouros de bovinos e suínos, ainda há a geração de resíduos do tecido ósseo das carcaças, constituídos basicamente de cálcio e potássio, já a carne de frango é comercializada juntamente com os ossos, reduzindo o volume de resíduo sólido gerado em comparação com as outras linhas de processamento. Como qualquer dejetos disposto inadequadamente ao ambiente pode se tornar um importante fator de poluição. Assim a temática para redução do impacto ambiental e sustentabilidade do sistema de produção animal é cada vez mais discutida na comunidade científica ao redor do mundo (MARQUES et al., 2012).

A insolubilidade dos resíduos lipídicos nos corpos hídricos os 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).

Contudo, as gorduras de origem animal são constituídas de ácidos graxos de cadeias longas, acima de dez carbonos, possuindo como principal desvantagem para a síntese de biocombustíveis sua apresentação na forma sólida à temperatura ambiente, tornando o processo de transesterificação em escala industrial oneroso devido ao alto custo energético necessário para liquefazer essas gorduras, inviabilizando a produção de biodiesel a partir dessas fontes (ALPTEKIN & CANAKCI, 2011).

A reação pode ser via catálise ácida, alcalina ou 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).

No entanto, apesar do uso de enzimas purificadas apresentarem as vantagens citadas, seu custo de produção e purificação é alto o suficiente para formar uma barreira a sua disseminação e emprego na produção em grande escala de biodiesel a partir dessas fontes residuais, dessa forma, medidas para mitigar ou eliminar essas dificuldades se tornam essenciais para conduzir esse processo com viabilidade econômica (ANTCZAK et al., 2009).

Levantado esses aspectos, micro-organismos lipolíticos que produzam exoenzimas se apresentam como potenciais agentes para atuar nesse ramo da bioenergia. 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, em cepas de *Staphylococcus xylosus*, uma bactéria normalmente isolada de produtos cárneos fermentados responsável pela estabilização da cor, decomposição de peróxidos e formação de aroma devido a suas atividades proteolíticas e lipolíticas (KOZACINSKI et al., 2008).

Assim, este trabalho teve por objetivo realizar a hidrólise enzimática microbiana de resíduos graxos bovinos através de biotécnicas, a fim de reduzir as cadeias dos ácidos graxos diminuindo o ponto de fusão desses compostos, facilitando as reações químicas de produção de biodiesel.



## 2 Materiais e Métodos

### 2.1. Coleta de amostras

As amostras dos resíduos graxos foram coletadas em 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 1,5kg, 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 Famile 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 bovinos, 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<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup>), “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 estoque de *Staphylococcus xylosus* foram utilizadas no experimento. Pertencente a família das *Micrococcaceae*, o *Staphylococcus xylosus* é uma bactéria mesófila, gram-positiva, com certificação GRAS (do inglês, *Generally Recognized as Safe*) de segurança pela agência de vigilância e controle de alimentos e substâncias americana (*Food and Drug Administration* – FDA), em aerobiose apresenta crescimento ótimo, podendo ainda ser anaeróbio facultativo, porém com desenvolvimento menos significativo. É amplamente empregada 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  $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$  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  $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$  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  $10^8$  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  $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$  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  $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$  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 bovinas

As amostras de gorduras bovinas 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  $35 \pm 0,1^\circ\text{C}$  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 bovinas

Resíduo	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes
	Tempo de fermentação (h)	Concentração de gordura (%)	
Sebo bovino	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 adotado 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 bovinos antes da fermentação. A umidade da gordura bovina foi inferior ao limite máximo estabelecido pela literatura de 0,06%, portanto, dentro dos parâmetros adequados para sofrerem transesterificação por qualquer via catalítica sem a necessidade de passar por operação de secagem (MA et al., 1998). A acidez livre encontrada (0,102 mg KOH.g<sup>-1</sup>) também está de acordo com o limiar estabelecido na literatura para gorduras animais propícias a passarem pelo processo de transesterificação segundo Ma et al. (1998) que relatam a necessidade de uma pré-esterificação dos resíduos graxos, a fim de neutralizar os ácidos graxos livres resultantes da decomposição natural dos lipídios para emprego de uma catálise alcalina em gorduras animais com índice de acidez acima de 1 mg KOH.g<sup>-1</sup>.

Tabela 2 - Propriedades físicas das gorduras animais in natura

Propriedades	Sebo Bovino*	Método
Umidade (%)	0,01 ± 0,012	Secagem em estufa (AOAC, 1995)
Acidez (mg KOH.g <sup>-1</sup> )	0,102 ± 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 bovina ao longo da fermentação

Concentração (%)	PF (°C)				
	Tempo de fermentação (h)				
	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
2	65,50 <sup>1,a</sup>	57,75 <sup>2,a</sup>	58,00 <sup>2,a</sup>	57,75 <sup>2,a</sup>	57,25 <sup>2,a</sup>
4	63,25 <sup>1,a</sup>	58,50 <sup>2,a</sup>	57,50 <sup>2,a</sup>	57,75 <sup>2,a</sup>	57,25 <sup>2,a</sup>
6	63,75 <sup>1,a</sup>	57,75 <sup>2,a</sup>	57,50 <sup>2,a</sup>	53,75 <sup>3,a</sup>	54,75 <sup>3,ab</sup>
8	63,75 <sup>1,a</sup>	59,25 <sup>2,a</sup>	57,25 <sup>2,a</sup>	53,75 <sup>3,a</sup>	51,00 <sup>4,bc</sup>
10	62,50 <sup>1,a</sup>	59,25 <sup>2,a</sup>	56,75 <sup>3,a</sup>	49,00 <sup>4,b</sup>	48,00 <sup>4,c</sup>

\* 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  $74^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ .

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, a maior quebra de cadeia lipídica foi identificada ao utilizar uma concentração de 10% de gorduras no meio em 6h de processo.

Esse efeito da fermentação microbiana pode ser explicado pela tendência dos seres vivos em utilizar sempre a rota mais simples para obtenção de energia. Quando a concentração de meio de cultura é alta (2% de gordura e 98% de meio), há um grande aporte de nutrientes facilmente absorvíveis, assim, não há necessidade de síntese da serina hidrolase para obtenção de energia a partir dos ácidos graxos de cadeia longa. No entanto, conforme a fermentação avança e os nutrientes mais simples se esgotam, as células detectam a necessidade de extrair energia de outras fontes, produzindo as exoenzimas para hidrólise da gordura animal, além disso, à medida que o tempo avança, um maior número de células está presentes no reator, aumentando gradativamente a taxa de consumo de nutrientes. Conforme o teor de gordura se eleva no meio, há uma menor disponibilidade de nutrientes do meio de cultura, induzindo as bactérias a produzirem lipases para iniciar a metabolização de carbono a partir dos resíduos graxos ocasionando a quebra da cadeia carbonada dos triglicerídeos e consequentemente a queda no ponto de fusão (HORN et al., 2007; TANO-DEBRAH et al., 1999).

Considerando que a matéria-prima é um resíduo agroindustrial, é desejada sua máxima utilização possível sem que prejudique o processo, assim como ótimo operacional, podemos observar que em 6h de fermentação foi suficiente para causar a queda de aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$  no ponto de fusão nas concentrações de 10% chegando ao entorno de  $49^{\circ}\text{C}$  na temperatura de pico (LIDE, 2007).

#### 4 Conclusão

Concluimos que a fermentação causada por *Staphylococcus xylosus* em gorduras de bovinos causam uma queda significativa em seus pontos de fusão devido a quebra na cadeia carbonada dos ácidos graxos, reduzindo os custos energéticos para liquefação da gordura, permitindo que processos químicos para obtenção do biodiesel sejam realizados em temperaturas mais amenas, reduzindo gastos e aumentando o rendimento da atividade.





## 5 Referências

ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M. *Optimization of transesterification for methyl ester production from chicken fat*. **Bioresource Technology**. v.102, p.6385-6391, 2011.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. *Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process*. **Renewable Energy**. v.34, p.1185-1194, 2009.

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.

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.

FAO – Food and Agricultural Organization of United Nations. **Food Outlook: Global Market Analysis – June 2011**. Disponível em: <<http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm>>. Acesso em: 11 jul. 2013.

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

HORN, S. J.; ASPMO, S. I.; EIJSINK, V. G. H. *Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.40, n.5, p.1328-1334, 2007.

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.

LIDE, D. R. **Handbook of chemistry and physics**. 88º Ed. Boca Raton – Florida: CRC Press. 2007.



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.

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.

PETERLINI, G. H. C. Diagnóstico e proposta de minimização da geração da geração de resíduos em frigorífico industrial. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL. 2012. Goiânia. Anais do III Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. Disponível em: <<http://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2012/II-006.pdf>>. Acesso em: Jul 2013.

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.

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.