



## HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE EFLUENTE SINTÉTICO: ESTUDO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Letícia Poletto<sup>1</sup>

Aniela Pinto Kempka<sup>1</sup>

Rosa Cristina Prestes<sup>2</sup>

### RESUMO

O alto conteúdo de proteína presente em efluentes de frigoríficos e de laticínios pode levar a uma baixa taxa de biodegradação nos sistemas de tratamento biológico convencionais. O uso de enzimas hidrolíticas como coadjuvantes nestes processos de tratamento pode ser uma alternativa para o aumento da eficiência da biodegradação, pois estas, ao hidrolisarem o substrato, tornam este mais facilmente assimilável para os microrganismos. O objetivo deste trabalho foi estudar melhores condições de pH, temperatura e concentração de papaína na hidrólise de efluente sintético. Foram utilizados efluentes sintéticos, sendo a fração proteica simulada com o uso de albumina de soro bovina (BSA) e gelatina. Foram obtidos diferentes perfis de decaimento da concentração de proteína para a BSA e para a gelatina, sendo a enzima testada, a papaína, mais eficiente na hidrólise da BSA. As condições de hidrólise para o efluente simulado com BSA foram pH 5 e 6 e temperatura de 36°C, para todas as concentrações de enzima testadas. Para o efluente simulado com a gelatina, todas as variáveis testadas exerceram efeito significativo ( $p < 0,05$ ), com ótimo de pH entre 5 e 6, temperatura de 30°C e concentração de enzima de 0,1%.

**Palavras-chave:** Proteína; Papaína; pH; Concentração; Temperatura.

### ABSTRACT

**Enzymatic hydrolysis of protein in wastewater synthetic: study of operating conditions.** The high content of protein present in wastewaters of slaughterhouse and dairy industries may lead to a low rate of biodegradation in conventional biological treatment systems. The use of hydrolytic enzymes as adjuvants in treatment systems may be an alternative to increasing the efficiency of biodegradation since the enzymes hydrolyze the substrate, making the substrate more easily

<sup>1</sup> Depto. de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química - DEAQ, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, SC, Brasil. E-mail para correspondência: [aniela.kempka@udesc.br](mailto:aniela.kempka@udesc.br).

<sup>2</sup> Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, RS, Brasil.

assimilable to the microorganisms. The objective of this study was optimizing the best conditions of pH, temperature and concentration of papain in the hydrolysis of synthetic wastewater. Were used synthetic wastewater with the protein fraction simulated using bovine serum albumin (BSA) and gelatin. Were obtained different profiles of protein concentration decay for the BSA and the gelatin with the enzyme tested, papain, the most efficient hydrolysis of BSA. The hydrolysis conditions for simulated wastewater with BSA were pH 5-6 and temperature of 36°C, for all concentrations of enzyme. For the simulated wastewater with gelatin, all variables tested presented significant effect ( $p < 0.05$ ), with pH optimum between 5- 6, temperature of 30°C and concentration of enzyme of 0.1%.

**Keywords:** Protein; Papain; pH; Concentration; Temperature.

## INTRODUÇÃO

O lançamento de efluentes líquidos no meio ambiente pode resultar em variações das características físico-químicas dos corpos receptores fazendo com que os seres que dependem direta ou indiretamente desse curso d'água sofram as consequências destas variações (Silva *et al.*, 2005). De acordo com a Resolução Conama N° 430, de 13 de maio de 2011, artigo 3°, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis e ainda, o órgão ambiental competente poderá, a qualquer momento, mediante fundamentação técnica: I - acrescentar outras condições e padrões para o lançamento de efluentes, ou torná-los mais restritivos, tendo em vista as condições do corpo receptor; ou II - exigir tecnologia ambientalmente adequada e economicamente viável para o tratamento dos efluentes, compatível com as condições do respectivo corpo receptor (Brasil, 2011).

Em frigoríficos, assim como em vários tipos de indústria, o alto consumo de água acarreta grandes volumes de efluentes, sendo que 80 a 95% da água consumida é descarregada como efluente líquido. Estes efluentes contêm frequentemente gorduras e proteínas em quantidades significativas. Parte da carga orgânica pode ser removida pelo tratamento físico-químico, entretanto, o custo destes reagentes é elevado e a eficiência da remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO) pode ser baixa. As gorduras e as proteínas presentes nestes efluentes têm um baixo coeficiente de biodegradabilidade (Cammarota e Freire, 2006). Devido à complexidade da composição dos efluentes industriais, se fazem necessárias as associações de diversos níveis de tratamento para a obtenção de efluentes com a qualidade requerida pelos padrões de lançamento (Philippi, 2004).

A aplicação de um processo de pré-tratamento para hidrolisar e dissolver as proteínas pode melhorar a degradação biológica de águas residuais, acelerar o processo e por consequência, reduzir o tempo residência do efluente no sistema de tratamento (Kempka *et al.*, 2013).

As proteínas de origem animal são polímeros complexos, contendo um número elevado de aminoácidos e massa molecular elevada (Ribeiro e Seravalli, 2004) e a sua estrutura pode dificultar o tratamento biológico. Como alternativa, para auxiliar na etapa de biodegradação, pode-se utilizar enzimas, como proteases, que irão hidrolisar as proteínas em polímeros menores melhorando a degradação biológica de efluentes proteicos, acelerando o processo e reduzindo o tempo. Com a hidrólise, as proteínas são convertidas em pequenos polímeros denominados peptídeos, ou aminoácidos propriamente ditos, que irão auxiliar no metabolismo dos micro-organismos (Cammarota e Freire, 2006). Os micro-organismos, então, convertem a matéria orgânica, particulada e dissolvida, em produtos finais mais simples.

As proteases (EC 3.4) são enzimas que pertencem ao grupo das hidrolases. São responsáveis por catalisar a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. As proteases têm sido usadas para modificar a estrutura das proteínas, como por exemplo, a hidrólise da caseína do leite (Koblitz, 2008; Dias *et al.*, 2010). De acordo com Benitez *et al.* (2008), o Grau de Hidrólise final é determinado pelas condições utilizadas, tais como: concentração de substrato, relação enzima/substrato, tempo de incubação e, também, as condições físico-químicas, como pH e temperatura.

A papaína (EC 3.4.22.2) é uma cisteína-protease extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*) (Koblitz, 2008) com forte ação proteolítica, amplamente utilizada na indústria de alimentos (Monti *et al.*, 2004). Normalmente, a papaína apresenta atividade proteolítica em valores de pH de 5,0 a 9,0. Sua atividade ótima é observada em temperaturas de 60°C a 70°C. São ativadas na presença de agentes redutores e inativadas por agentes oxidantes e substâncias que reagem com grupo sulfidril (Koblitz, 2008).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da utilização de papaína, em diferentes pHs, temperaturas e proporções da enzima, na hidrólise de proteína de efluente sintético, sendo a fração de proteína simulada com o uso de albumina de soro bovina (BSA) e gelatina alimentícia, buscando-se otimizar o processo de hidrólise destas proteínas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química - DEAQ da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Campus de Pinhalzinho - SC. Como substratos, foram utilizados albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) e gelatina bovina tipo B, *Bloom* 250 g (Gelnex). A enzima utilizada foi uma papaína comercial (AB enzymes GmbH).

## Planejamento dos experimentos de hidrólise

Para verificação da influência da temperatura, do pH e concentração de enzima na hidrólise das proteínas do efluente sintético, utilizou-se a metodologia de planejamento de experimentos. A tabela 1 apresenta o planejamento experimental  $3^{(3-1)}$  com os valores reais das variáveis estudadas e valores codificados (entre parêntesis). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Foram preparadas soluções com concentrações de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de BSA e gelatina, separadamente, em tampão fosfato de sódio  $100 \text{ mM}$  em diferentes pHs (de acordo com os experimentos do planejamento), visando simular as proteínas contidas em efluente de frigoríficos, sendo este denominado efluente sintético.

A hidrólise do efluente foi conduzida em Erlenmeyers de  $250 \text{ mL}$ , devidamente vedados, contendo  $50 \text{ mL}$  do efluente sintético, sendo estes acondicionados em agitador orbital (Solab) a  $50 \text{ rpm}$ , e nas condições descritas para cada experimento. Os intervalos de tempo para coleta das amostras foram a cada  $20 \text{ minutos}$  totalizando  $120 \text{ minutos}$  de processo enzimático, tempo este fixando em testes preliminares. Os resultados foram expressos em Grau de Hidrólise, calculado pela relação entre a concentração de proteína na amostra sem a adição da enzima ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e a concentração de proteína na amostra com adição da enzima, para cada tempo.

Tabela 1. Planejamento experimental  $3^{(3-1)}$  com valores reais e codificados (entre parêntesis) utilizado na hidrólise do efluente sintético.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	Concentração de enzima (% m/V)
E1	30 (-1,0)	5 (-1,0)	0,1 (-1,0)
E2	30 (-1,0)	6 (0,0)	0,5 (+1,0)
E3	30 (-1,0)	7 (+1,0)	0,3 (0,0)
E4	33 (0,0)	5 (-1,0)	0,5 (+1,0)
E5	33 (0,0)	6 (0,0)	0,3 (0,0)
E6	33 (0,0)	7 (+1,0)	0,1 (-1,0)
E7	36 (+1,0)	5 (-1,0)	0,3 (0,0)
E8	36 (+1,0)	6 (0,0)	0,1 (-1,0)
E9	36 (+1,0)	7 (+1,0)	0,5 (+1,0)

Para determinar a concentração de proteína (em  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) em cada tempo de hidrólise, utilizou-se o método de Biureto. Este método consiste em determinar a concentração protéica de uma amostra através da reação desta com o reagente de Biureto e posterior leitura da absorbância. A reação de Biureto só ocorre com os compostos que contém duas ou mais ligações peptídicas e esta reação produz uma cor azul devido ao complexo de coordenação entre o cobre e quatro átomos de nitrogênio. Para tanto, após a centrifugação (Cienlab) dos hidrolisados a  $4.000 \text{ rpm}$ , transferiu-se  $2 \text{ mL}$  de sobrenadante para um tubo de ensaio no qual foram adicionados  $8 \text{ mL}$  de reagente de Biureto. Os tubos de ensaio permaneceram em repouso por  $30 \text{ minutos}$  a temperatura ambiente e

após este tempo, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro (Biospectro) a 540 nm (Macedo *et al.*, 2005). O valor da concentração de proteína foi calculado através da equação linear obtida de uma curva de calibração utilizando albumina de soro bovina como padrão (Merck).

### **Análise estatística dos resultados experimentais**

A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada utilizando-se o software Statistica<sup>®</sup> 10.0 (Statsoft, Inc.) onde foram buscados os efeitos isolados e de interação entre as variáveis do planejamento proposto e Teste de Tukey, em nível de 95% de confiança.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A tabela 2 mostra a média dos percentuais de hidrólise obtidos após 120 minutos de processo para cada experimento com BSA e gelatina como substratos, o desvio padrão e o Teste de Tukey em nível de 95 % de confiança. De acordo com os resultados obtidos para BSA, verifica-se que o experimento E1 difere estatisticamente dos experimentos E2, E3, E6 e E9, chegando a 100% de hidrólise da proteína. Para a gelatina, o maior percentual de grau hidrólise foi obtido para o experimento E1, sendo este diferente estatisticamente dos demais experimentos, com 81,49 % de GH. O comportamento da enzima em relação à hidrólise da BSA e da gelatina diferiu, sendo que para a BSA, o menor valor de percentual de hidrólise foi 66,79%, já para a gelatina, o menor valor foi de 45,46%. Isto pode ser justificado pela diferença em relação à estrutura química destes substratos.

Do ponto de vista químico, a gelatina é composta por grandes cadeias de aminoácidos, ligados por ligações peptídicas e estes aminoácidos contêm grupos funcionais ácidos e básicos. Durante o processo alcalino de obtenção da gelatina tipo B, alguns grupos específicos se rompem dando lugar à hidrólise das ligações cruzadas que mantêm as unidades de tropocolágeno; assim se mantêm as ligações intramoleculares das unidades básicas e o produto solubiliza-se facilmente em água. O processo alcalino pode gerar moléculas ligeiramente ramificadas com massas moleculares de 10 a 60 kDa (Ockerman e Hansen, 1994). Sobral *et al.* (2001), ao caracterizarem gelatina de origem bovina, encontraram a glicina como sendo o aminoácido predominante (22,16 g/100g de amostra), seguindo da alanina (12,92g/100g de amostra) e do ácido glutâmico (11,98g/100g de amostra). Albuminas séricas também são moléculas relativamente grandes, de massas moleculares em torno de 60 kDa e carregadas negativamente (Majorek *et al.*, 2012). A estrutura secundária da albumina bovina contém muitos resíduos de cistina e estes são helicoidais em grande parte da cadeia (Tattini *et al.*, 2006). No estudo realizado por Kempka *et al.* (2014) ao obter o perfil de aminoácidos de gelatina bovina (Gelnex), verificou que os aminoácidos que estão presentes em quantidades baixas são a histidina, a tirosina, a metionina e a cistina.

Tabela 2. Médias do Grau de Hidrólise (GH), desvio padrão e Teste de Tukey para os experimentos de hidrólise enzimática de BSA e gelatina utilizando papaína e bromelina.

Experimento	GH (%) para a BSA ± Desvio Padrão	GH (%) para a gelatina ± Desvio Padrão
E1	100,00 <sup>a</sup> ± 0,01	81,49 <sup>a</sup> ± 0,02
E2	97,28 <sup>bc</sup> ± 0,04	69,58 <sup>b</sup> ± 1,98
E3	66,79 <sup>e</sup> ± 1,78	48,60 <sup>ef</sup> ± 1,98
E4	97,46 <sup>abc</sup> ± 0,22	59,10 <sup>d</sup> ± 0,01
E5	99,34 <sup>ab</sup> ± 0,23	62,94 <sup>cd</sup> ± 2,47
E6	73,40 <sup>d</sup> ± 0,45	53,15 <sup>e</sup> ± 0,49
E7	97,77 <sup>abc</sup> ± 0,66	63,99 <sup>cd</sup> ± 0,99
E8	99,99 <sup>a</sup> ± 0,01	68,19 <sup>bc</sup> ± 0,01
E9	96,51 <sup>c</sup> ± 0,23	45,46 <sup>f</sup> ± 1,48

Letras minúsculas iguais, na coluna, correspondem as médias de GH (%) iguais, significativamente, pelo Teste de Tukey em nível de 95 % de confiança ( $p > 0,05$ ).

A papaína é uma protease cisteínica cuja estratégia de ação é a ativação do radical de cisteína por uma histidina, fazendo a função de nucleófilo que ataca a ligação peptídica (Coelho *et al.*, 2008). Esta forma de ação pode justificar o maior percentual de hidrólise obtido para a albumina de soro bovina, que contém os aminoácidos utilizados na reação de hidrólise realizada pela papaína em maior quantidade do que a gelatina.

### Perfis de decaimento da concentração de proteína ao longo do tempo

A figura 1 mostra os perfis de decaimento da concentração de BSA ao longo do tempo (minutos) de hidrólise para os experimentos com temperaturas de 30°C (a), 33°C (b) e 36°C (c). Observa-se que nos primeiros 20 minutos de hidrólise, todos os experimentos tiveram queda acentuada na concentração de proteína chegando a valores de proteína abaixo de 1%. A papaína caracteriza-se por ser uma enzima que possui elevado Grau de Hidrólise para substratos contendo lisina, arginina e glicina, aminoácidos estes presentes na molécula de BSA (Prata e Garbieri, 2005). Para os experimentos E3 e E6, a concentração final de proteína foi superior a 2%. Estes experimentos caracterizam-se pelo pH inicial igual a 7. Biazus *et al.* (2006), ao estudarem parâmetros de hidrólise de BSA utilizando papaína, obtiveram resultados próximos, sendo que em pH 7 a hidrólise foi menos efetiva do que em pH 5. No presente estudo, os experimentos com pH 5 e 6 tiveram resultados próximos em relação ao percentual de hidrólise (concentração de proteína) após 20 minutos de processo.

O comportamento da hidrólise ao longo do processo utilizando-se gelatina como substrato diferiu em relação ao comportamento utilizando BSA. A Figura 2 mostra os perfis de decaimento da concentração de proteína ao longo do tempo para as temperaturas de (a) 30°C, (b) 33°C e (c) 36°C.

Percebe-se, na figura 2a, que o comportamento da hidrólise para os experimentos E1, E2 e E3 seguiu a mesma tendência, porém com valores finais diferentes, após 120 minutos. Mesmo E1 contendo uma menor concentração inicial de enzima, o pH inicial do processo para este experimento foi 5, diferente dos experimentos E2 e E3, cujos valores de pH inicial foram 6 e 7, respectivamente, o que pode sugerir a preferência da enzima por valores de pH mais baixos.

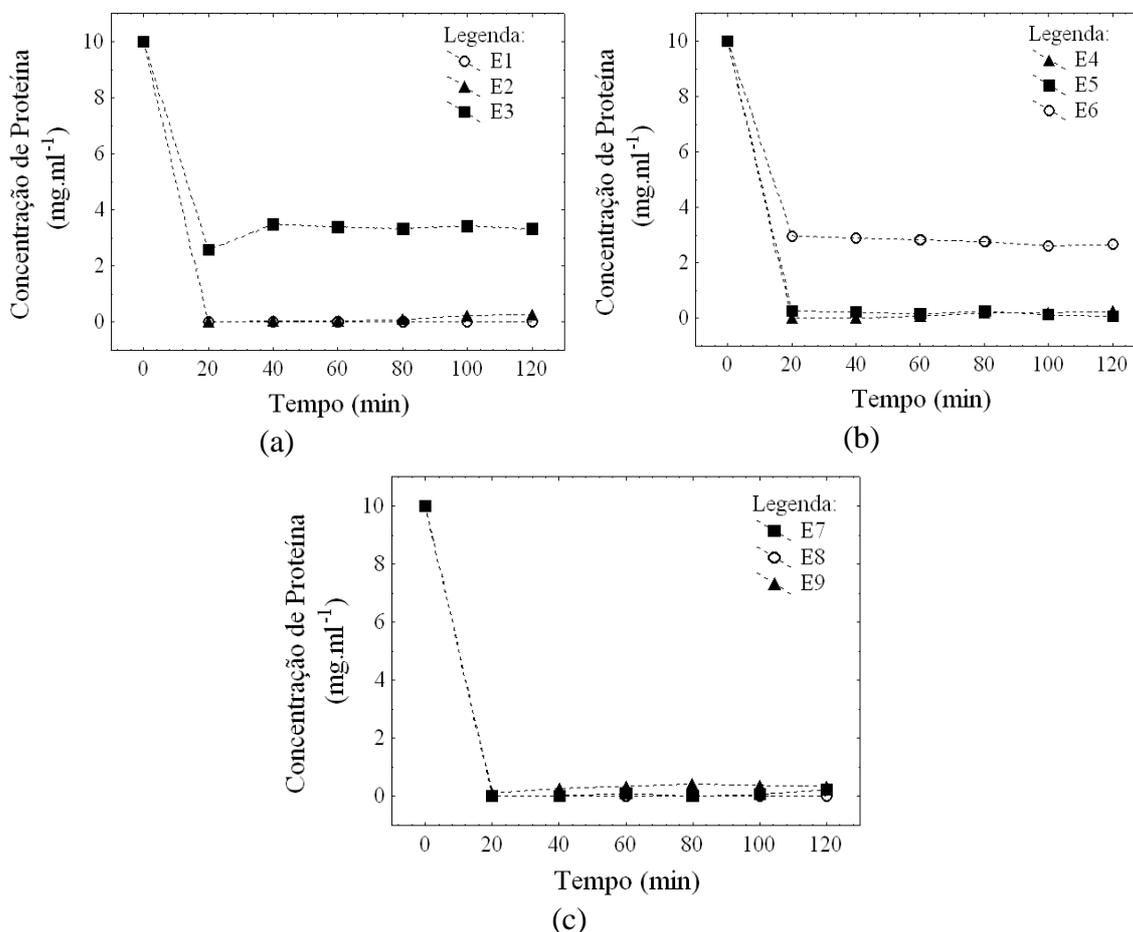


Figura 1. Perfis de decaimento da concentração de BSA em relação ao tempo para o processo de hidrólise para os experimentos a 30°C (a), 33°C (b) e 36°C (c).

Para os experimentos da figura 2a, os perfis de decaimento da concentração de proteína foram mais próximos, porém, mesmo com esta proximidade, percebe-se que o experimento E6, com pH inicial igual a 7, apresenta a maior concentração final de proteína. Na figura 2c, os experimentos que apresentaram menor concentração final de proteína foram E7 e E8, correspondentes novamente aos pH 5 e 6, respectivamente. O experimento E9, mesmo com a maior proporção de enzima (0,5%) não chegou a 50% de hidrólise da proteína. Nenhum dos experimentos, utilizando a gelatina como proteína, chegou a valores de concentração de proteína igual a zero (ou 100% de hidrólise). Tanto para a BSA como para gelatina, nas figuras 1 e 2, verifica-se que após 20 minutos de hidrólise, os perfis permaneceram constantes, o que pode sugerir uma possível inibição ou desnaturação da papaína. Elevadas concentrações de produtos formados ou baixa concentração do

substrato, presentes no meio reacional, podem provocar esta inibição ou um deslocamento do sentido da reação (Biazus *et al.*, 2006).

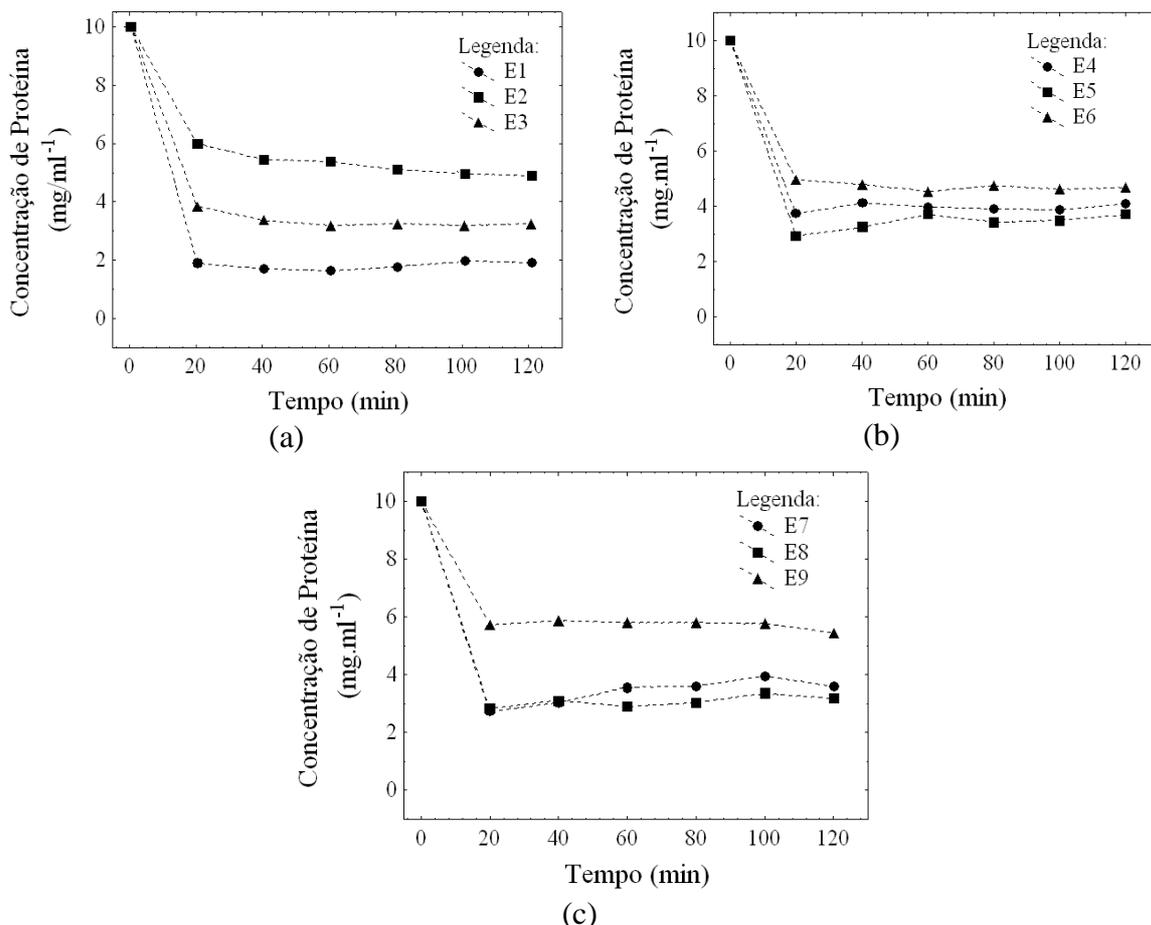


Figura 2. Perfis de decaimento da concentração de gelatina em relação ao tempo para o processo de hidrólise para os experimentos a 30°C (a), 33°C (b) e 36°C (c).

Após a realização do planejamento experimental para a BSA e para a gelatina, foram obtidos os efeitos das variáveis de estudo em relação ao percentual de hidrólise. Os diagramas de Pareto mostrados na figura 3 demonstram as variáveis que exerceram efeito significativo em nível de 95% de confiança na hidrólise da BSA (a) e da gelatina (b).

Pode-se observar que para a hidrólise da BSA as variáveis que exerceram efeito significativo foram o pH (com efeito significativamente negativo) e a temperatura (com efeito significativamente positivo). Isto significa que quando o pH passa de 5 para 7, o percentual de hidrólise diminui, o que pode sugerir a preferência da enzima por pHs tendendo a acidez. Já para a temperatura, o aumento de 30°C para 36°C levou a um maior percentual de hidrólise da BSA. Quando se aquece gradualmente uma proteína em solução, acima de uma temperatura crítica, ocorre uma transição abrupta de um estado nativo para o desnaturado, porém, para a BSA, esta temperatura é de 65°C (Damodaran *et al.*, 2010), indicando que a hidrólise ocorre apenas pela ação da enzima, que teve sua atividade aumentada com o aumento da temperatura. Para a hidrólise da gelatina, todas as variáveis de estudo exerceram efeito significativo, sendo todos negativos, o que demonstra

novamente a preferência da enzima por pHs mais ácidos, mas, para a gelatina, o aumento da temperatura levou a percentuais de hidrólise inferiores, ocorrendo o mesmo com o aumento da concentração da enzima, o que demonstra que a menor concentração de enzima testada foi mais eficiente na hidrólise da proteína.

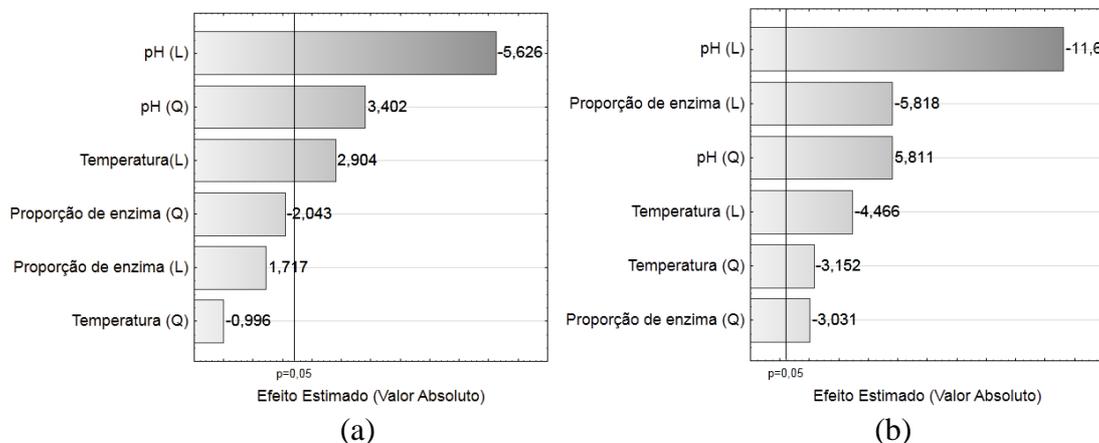


Figura 3. Diagramas de Pareto obtidos a partir da análise estatística dos dados de Grau de Hidrólise do efluente sintético contendo BSA (a) e gelatina (b), acrescidos de papaína.

Para a obtenção do modelo matemático que representasse o processo de hidrólise, foram calculados os coeficientes de regressão. Nas Equações 1 e 2 estão os modelos matemáticos empíricos, obtidos através destes coeficientes de regressão, para a hidrólise da BSA ( $R^2=0,982$ ) e para a hidrólise da gelatina ( $R^2=0,976$ ), respectivamente.

$$GH (\%) = 99,49 - 20,26.T + 112,84.pH - 10,22.pH^2 \quad (\text{Equação 1})$$

$$GH (\%) = 420,89 - 34,14.T + 89,73.pH - 88,65.E + 0,50T^2 - 8,27.pH^2 + 107,89E^2 \quad (\text{Equação 2})$$

onde GH (%) é o Grau de Hidrólise da proteína, T é a temperatura e E é a concentração de enzima.

Os modelos matemáticos obtidos permitiram a construção das Superfícies de Resposta para o processo de hidrólise da BSA (a) e da gelatina (b), apresentadas na figura 4.

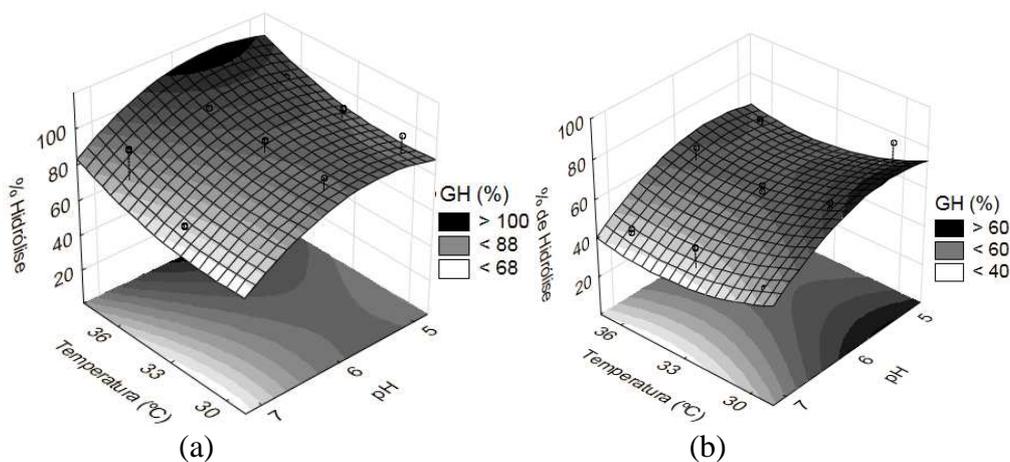


Figura 4. Superfícies de Resposta obtidas a partir da análise estatística dos dados de Grau de Hidrólise do efluente sintético obtido com BSA (a) e gelatina (b) e utilizando papaína.

Verifica-se que a região de maximização da hidrólise da BSA (Figura 4a) encontra-se entre os valores de pH de 5 e 6, e a temperatura de 36°C, sendo que a concentração de enzima não foi significativa para o processo. Para a gelatina (Figura 4b) a região de maximização da hidrólise encontra-se também em valores de pH 5 e 6 porém na temperatura de 30°C, e concentração de enzima de 0,1%.

## CONCLUSÕES

A hidrólise enzimática pode ser um coadjuvante no tratamento de efluentes que contenham proteínas, disponibilizando o substrato mais facilmente assimilável para os microrganismos. Verificou-se que o tempo de hidrólise necessário para reduzir consideravelmente a concentração de proteína no efluente sintético foi de 20 minutos de reação. Os resultados dos experimentos para determinação das melhores condições de hidrólise utilizando enzima papaína indicam que esta possui atividade hidrolítica mais acentuada sobre a albumina de soro bovino do que sobre gelatina, hidrolisando aproximadamente 100% e 81,49%, respectivamente, ou seja, a complexidade do arranjo dos aminoácidos na molécula da gelatina dificulta a ação da enzima, quando comparada à ação sobre a BSA. As melhores condições de hidrólise para a BSA e gelatina foram em pH 5 e 6, porém em diferentes temperaturas, 36°C para BSA e 30°C para gelatina. A proporção de enzima não teve efeito significativo na hidrólise da BSA, porém na hidrólise da gelatina, exerceu efeito significativo negativo, sendo a menor concentração testada (0,1%) a que levou ao maior percentual de hidrólise.

## REFERÊNCIAS

- BENITEZ, R.; IBARZ, A.; PAGAN, J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, **42**(2):227-236.
- BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R. 2006. Modelagem empírica do processo de biodegradação de efluentes proteicos por enzimas de *Carica papaya* sp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, **10**(2):436-440.
- BRASIL. Resolução CONAMA N° 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 10 de novembro de 2014.
- CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, **97**:2195-2210.

- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. 2008. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: EPUB, 288p.
- DIAS, D. R. et al. 2010. In vitro protein digestibility of enzymatically pre-treated bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour using commercial protease and *Bacillus* sp. Protease. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **30**(1):94-99.
- KEMPKA, A. P.; CELUPPI, R.; REVELLO, J. H. P. 2013. Lipase and phospholipase in the hydrolysis of lipids in wastewater from swine slaughterhouse and subsequent biological treatment study. **Journal of Agricultural Science and Technology A**, **3**:757-765.
- KEMPKA, A. P. et al. 2014. Influence of bloom number and plastifiers on gelatin matrices produced for enzyme immobilization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, **31**(1):95-108.
- KOBLITZ, M. G. B. 2008. **Bioquímica de Alimentos: Teorias e Aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242p.
- MACEDO, G. A. et al. 2005. **Bioquímica Experimental de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 187p.
- MAJOREK, K. A. et al. 2012. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. **Molecular Immunology**, **52**(3-4):174-82.
- MONTI, R.; CONTIERO, J.; GOULART, A. J. 2004. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* latex. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **47**(5):747-754.
- OCKERMAN, H. W.; HANSEN, C. L. 1994. **Industrialización de subproductos de origen animal**. Zaragoza: Acribia, 160p.
- PHILIPPI, A. J.; ROMÉRO, M. A.; BRUNA, G. C. (Eds.). 2004. **Curso de Gestão Ambiental**. Barueri: Manole, 1045p.
- PRATA, A. S.; SGARBIERI, V. C. 2005. Obtenção e caracterização química e nutricional in vitro das proteínas do soro de sangue bovino. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **25**(2):327-332.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. 2004. **Química de Alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 184p.
- SILVA, E. B. et al. 2005. Remoção de nutrientes em águas residuárias da indústria de conservas utilizando *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Veter**, **15**(1):19-23.
- SOBRAL, P. J. A. et al. 2001. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, **15**:423-432.
- STATSOFT, Inc. 2010. **Statistica 10.0**, St. Tulsa, OK, USA.

TATTINI, V. J. R.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. 2006. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42(1):127-136.