



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

QUITOSANA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE *ASPERGILLUS NIGER*
AN 400 VISANDO BIODEGRADAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS
CONTAMINADAS COM METIL PARATION

FORTALEZA – CEARÁ

2015

DELLANY OLIVEIRA DE ARAÚJO

**QUITOSANA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE *ASPERGILLUS NIGER*
AN 400 VISANDO BIODEGRADAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS
CONTAMINADAS COM METIL PARATION**

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo
Co-Orientadora: Dra. Tecia Vieira Carvalho

**FORTALEZA – CEARÁ
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Instituto Federal do Ceará - IFCE
Sistema de Bibliotecas - SIBI
Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A658q Araújo, Dellany Oliveira de.

Quitosana como suporte para imobilização de *Aspergillus Niger* AN 400 visando biodegradação de águas residuárias contaminadas com metil paration / Dellany Oliveira de Araújo. - 2015.
73 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental, Campus Fortaleza, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo.

Coorientação: Profa. Dra. Tecia Vieira Carvalho.

1. Gestão ambiental. 2. Quitosana. 3. Águas residuárias. 4. Biodegradação. I. Título.

CDD 628

DELLANY OLIVEIRA DE ARAÚJO

**QUITOSANA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE *ASPERGILLUS NIGER*
AN 400 VISANDO BIODEGRADAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS
CONTAMINADAS COM METIL PARATION**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e
Gestão Ambiental do Instituto Federal do
Ceará como requisito para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo - Presidente

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

Profa. Dra. Rita Mickaela Barros de Andrade

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

Profa. Dra. Teciá Vieira Carvalho

Parque de Desenvolvimento Tecnológico – PADETEC

*A Deus e a toda a espiritualidade
que sempre me guiam na batalha da vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo! Por me ter feito chegar até aqui. Nunca desistir! Esse foi o ensinamento divino que fez com que meu sonho se tornasse realidade.

Aos meus pais, Luciano e Margarida, por todo o investimento, carinho e compreensão. Às minhas irmãs, Dani, Ciana e Paulinha, pelo apoio e por sempre torcerem por meu crescimento acadêmico e profissional.

A Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva por suas orientações e compreensão nos momentos difíceis que passei durante essa longa caminhada.

A Profa. Dra. Teciá Vieira Carvalho, por me fazer acreditar que “anjos” realmente existem em nossas vidas, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e competência e por sua orientação e disponibilidade para a realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Araújo por ter me acolhido carinhosamente “do seu jeito”, desde os primeiros momentos no mestrado, por sua orientação e contribuições importantes para a finalização deste trabalho.

A Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa por ter disponibilizado o Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) onde realizei parte dos estudos laboratoriais, e em especial a Bárbara Barbosa, a quem devo muito pelas contribuições nesse trabalho.

A Antônia Neves Peçe pela contribuição ímpar nos desenvolvimentos experimentais.

Aos colegas da turma de mestrado, em especial, a Luís Carlos, que se tornou um grande amigo que quero ter pelo resto da vida.

Aos meus amigos e amigas pela compreensão da minha ausência e que mesmo não participando entenderam a importância desse processo para o meu crescimento. “Calma gente, estou voltando!”.

Ao Prof. Dr. Afrânio Aragão Craveiro por ter me acolhido no PADETEC, por ter disponibilizado a Central Analítica para a realização das análises cromatográficas.

A técnica Luzara de Matos Ribeiro, que foi fundamental nos desenvolvimentos analíticos realizados no PADETEC.

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos do PADETEC, na pessoa da bolsista Natália Aquino, pela disponibilidade na realização das análises microbiológicas.

Ao Laboratório de Análises de Traços do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, pela disponibilidade na realização dos primeiros ensaios cromatográficos.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), na pessoa da Profa. Dra. Celli Rodrigues Muniz, pela disponibilidade e atenção na realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A Secretária do Mestrado, Clédina Cavalcante, pela atenção, carinho, paciência e por todas as nossas longas conversas de descontração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização dessa pesquisa.

Aqueles que acreditaram e aqueles que não acreditaram na conclusão desse trabalho, pois só me deram forças para seguir em frente com fé e firmeza.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) pela bolsa concedida.

RESUMO

A biodegradação é uma tecnologia que visa à prevenção e a minimização de impactos antrópicos negativos empregando agentes biológicos para a recuperação de habitats naturais poluídos. Neste contexto a presente pesquisa teve como objetivo desenvolver produtos à base de quitosana de camarão, um polímero natural e biodegradável, contendo a espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 imobilizada visando remediar águas contaminadas por pesticida metil paration. Inicialmente foram preparadas esferas, filmes e membranas de quitosana comercial (66% de grau de desacetilação) e avaliadas a resistência da espécie fúngica à ação antimicrobiana da quitosana e a capacidade de imobilização de *Aspergillus niger* AN 400 pelo suporte orgânico. Os filmes de quitosana (suporte selecionado) foram avaliados quanto a sua solubilidade em tampão fosfato (pH = 6,0) e quanto a atividade biodegradante ao metil paration em meio aquoso sintético via reator biológico em batelada. O reator foi operado durante 7 dias e os parâmetros de demanda química de oxigênio (DQO), concentração de pesticida e pH foram monitorados. Os resultados mostraram que a imobilização dos esporos foi bastante viável, principalmente nos filmes de quitosana, onde os fungos se desenvolveram de forma semelhante à observada no meio de crescimento sem quitosana. Para a biodegradação do pesticida, a eficiência total do sistema foi de 85,4% em 48 horas de tratamento. Em termos de DQO, a melhor eficiência de remoção da matéria orgânica (96,8%) ocorreu no 2º dia de operação. O pH manteve-se ácido, entre 2,9 e 3,2, durante quase todo tratamento, confirmando a formação de compostos ácidos durante o metabolismo fúngico. Em geral, estes resultados confirmam o potencial promissor do uso de fungos imobilizados em quitosana no tratamento de águas residuárias contaminadas com pesticidas.

Palavras-chave: Quitosana, *Aspergillus niger*, Imobilização, Metil paration, Biodegradação.

ABSTRACT

Biodegradation is a technology aimed at the prevention and minimization of negative anthropic impacts using biological agents for recovery of natural habitats polluted. In this context, this study aims to develop products to shrimp chitosan-based, natural and biodegradable polymer, containing the fungal species *Aspergillus niger* AN 400 immobilized to biodegradation of contaminated water by methyl parathion pesticide. Initially beads, films and membranes were prepared from commercial chitosan (66% deacetylation degree) and evaluated the resistance to the fungal species to the antimicrobial activity of chitosan and immobilization capacity of *Aspergillus niger* AN 400 support the organic. The chitosan films (selected support) were evaluated for their solubility in phosphate buffer (pH = 6.0) and biological activity of system was observed for the degradation of methyl parathion in synthetic aqueous medium using a biological batch reactor. The reactor was operated for seven days and the parameters of chemical oxygen demand (COD), pesticide concentration and pH were monitored. The results showed that the immobilization of the spores was quite feasible, mainly in the chitosan films, where fungi have developed similar to that observed in the growth medium without chitosan. For the pesticide biodegradation in aqueous medium, the global efficiency was 85.4% at 48 hours of treatment. In terms of COD, the best removal efficiency of organic matter (96.8%) occurred at the 2nd day of operation. The acid pH remained between 2.9 and 3.2 during most of the treatment, confirming the formation of acidic compounds during fungal metabolism. In general, these results confirm the promising potential use of fungi in immobilized chitosan in treating wastewater contaminated with pesticides.

Keywords: Chitosan, *Aspergillus niger*, Immobilization, Methyl parathion, Biodegradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas genéricas da quitina (A) e da quitosana (B).....	19
Figura 2 – Ciclo da quitina.....	21
Figura 3 - Principais métodos de imobilização de células microbianas.....	23
Figura 4 - Estrutura química do metil paration.....	35
Figura 5 - Quitosana comercial em pó utilizada na pesquisa.....	37
Figura 6 - Solução de quitosana sob agitação mecânica.....	40
Figura 7 - Sistema de gotejamento para produção de esferas de quitosana.....	40
Figura 8 - Ensaio de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> AN 400 nos diferentes suportes de quitosana preparados.....	43
Figura 9 - Imagem do reator em batelada com biomassa fúngica imobilizada sobre suporte de quitosana (a) e do reator controle (b) usados nos estudos de biodegradação do pesticida metil paration.....	46
Figura 10 - Placas utilizadas como "controle" (meio de cultura e gel de quitosana) nos ensaios de avaliação do efeito fungicida da quitosana ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400.....	49
Figura 11 - Placas utilizadas como indicador negativo da ação fungicida da quitosana ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400. Composição: meio de cultura e esporos.....	49
Figura 12 - Placas utilizadas como indicador positivo da ação fungicida da quitosana ao <i>Aspergillus niger</i> AN 400. Composição: meio de cultura, gel de quitosana e esporos fúngicos.....	49
Figura 13 - Imagem das esferas de quitosana obtidas na pesquisa.....	50
Figura 14 - Imagens da membrana (a) e filme de quitosana (b) obtidos na pesquisa.....	51
Figura 15 - Ensaio de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> AN 400 nos suportes de quitosana.....	52
Figura 16 - Aspecto superficial do filme de quitosana sem células imobilizadas (a) e do filme de quitosana com <i>Aspergillus niger</i> AN 400 imobilizado (b).....	54
Figura 17 - Imagens do reator em batelada com biomassa fúngica imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 (RBF) em operação em diferentes tempos reacionais. a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h, d) 72 h, e) 96 h, f) 168 h.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - A carcinicultura nas regiões brasileiras.....	17
Tabela 2 - Macronutrientes minerais essenciais aos fungos.....	30
Tabela 3 - Micronutrientes minerais essenciais aos fungos.....	30
Tabela 4 - Efeitos a saúde causados pela exposição a pesticidas.....	34
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas do metil paration.....	35
Tabela 6 - Especificações comerciais da quitosana comercial.....	37
Tabela 7 - Composição do meio mineral que alimentou os reatores biológicos na etapa de crescimento da biomassa fúngica.....	44
Tabela 8 - Composição química da solução de Vishniac empregada como fonte mineral nos reatores biológicos em batelada.....	45
Tabela 9 - Condições analíticas do sistema HPLC usado na determinação do pesticida metil paration.....	47
Tabela 10 - Características físico-químicas da quitosana comercial usada neste trabalho.	48
Tabela 11- Biodegradação de metil paration durante o tratamento biológico com <i>Aspergillus niger</i> AN 400 imobilizado em suporte de quitosana. Massa de filme = 18,1 ± 0,9 g.....	55
Tabela 12 - Valores de matéria orgânica durante o tratamento biológico com <i>Aspergillus niger</i> AN 400 imobilizado em suporte de quitosana. Massa de filme = 18,1 ± 0,9 g.....	56
Tabela 13 - Variações de pH obtidos durante os ensaios de biodegradação nos reatores em batelada contendo biomassa fúngica imobilizada (RBF) e controle (RC).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DQO	Demanda Química de Oxigênio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
LATAM	Laboratório de Tecnologia Ambiental
LBA	Laboratório de Biotecnologia Ambiental
OMS	Organização Mundial de Saúde
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico
UFC	Universidade Federal do Ceará
MMA	Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal
MS	Ministério da Saúde
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Carcinicultura no Brasil.....	16
3.2 Resíduos da carcinicultura: impactos e utilidades.....	18
3.3 Quitina e quitosana.....	19
3.4 Atividade antimicrobiana da quitosana.....	22
3.5 Imobilização celular.....	23
3.6 Biodegradação.....	25
3.6.1 O uso de micro-organismos na biodegradação.....	27
3.7 Fungos: a espécie <i>Aspergillus niger</i>.....	28
3.8 A contaminação ambiental por pesticidas.....	31
3.9 O pesticida metil paration.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Identificação da quitosana comercial.....	37
4.2 Caracterização físico-química da quitosana comercial.....	38
4.2.1 Perda por dessecação.....	38
4.2.2. Determinação do pH.....	38
4.2.3 Resíduo de ignição (Cinzas).....	38
4.2.4 Grau de desacetilação.....	39
4.2.5 Teor de material insolúvel.....	39
4.3 Produção dos suportes de quitosana.....	39
4.3.1 Preparação da solução de quitosana.....	40
4.3.2 Produção de esferas de quitosana.....	40
4.3.3 Imobilização do <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em esferas de quitosana.....	41
4.3.4 Produção de membranas e filmes de quitosana.....	41
4.3.5 Imobilização do <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em membranas e filmes de quitosana....	42
4.4 A linhagem <i>Aspergillus niger</i> AN 400.....	42
4.5 Resistência à ação fungicida da quitosana.....	42

4.6 Ensaio de crescimento do <i>Aspergillus niger</i> para seleção do suporte de quitosana.....	43
4.7 Teste de solubilidade do suporte de quitosana selecionado.....	43
4.8 Microscopia eletrônica de varredura do suporte de quitosana selecionado.....	44
4.9 Biodegradação do pesticida metil paration.....	44
4.9.1 Montagem dos reatores em bateladas.....	44
4.9.2 Operação dos reatores em bateladas.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Caracterização da quitosana comercial.....	48
5.2 Resistência à ação fungicida do <i>Aspergillus niger</i> AN 400 a quitosana.....	48
5.3 Produção dos suportes de quitosana e seleção do sistema de imobilização.....	50
5.4 Seleção do suporte de quitosana para o ensaio de biodegradação.....	52
5.5 Caracterização do filme de quitosana.....	53
5.5.1 Teste de solubilidade.....	53
5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
5.6 Ensaio de remoção do pesticida metil paration com o suporte selecionado.....	54
6 CONCLUSÕES.....	59
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura (criação de camarões em cativeiro) é uma das atividades da aquicultura que mais cresce no Brasil, principalmente na Região Nordeste. Atualmente, o estado do Ceará ocupa lugar de destaque sendo o principal produtor do país, seguido pelos estados do Rio Grande do Norte e Bahia. O potencial da Região Nordeste na exploração da carcinicultura em comparação as outras regiões se dá em função da alta rentabilidade econômica, elevada produtividade e fácil adaptação aos mais diversos tipos de cultivo, além de propiciar a geração de emprego e renda nessas regiões que possuem altos índices de desemprego e pobreza. Conforme Frota (2005), o camarão cultivado se consolida como líder das exportações do setor pesqueiro nacional e evidencia que pode colaborar na expansão dos superávits da balança comercial, captando divisas essenciais para fortalecer a posição financeira do Brasil no âmbito internacional.

Os resíduos gerados por essa atividade são compostos basicamente pela carapaça dos camarões, que apresenta em sua composição a quitina um polímero que após desacetilação se transforma em quitosana que vem sendo empregada em usos diversos na área alimentícia, médica, cosmética, agricultura, biotecnológica, dentre outras. A quitosana tem características como biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de ser um produto natural, de baixo custo, atóxico, renovável e farto. Atualmente vem sendo utilizada como matéria prima no desenvolvimento de materiais suportes para imobilização de células. Porém, ainda são poucos os trabalhos que relatam o uso desse polímero em função da reconhecida atividade antimicrobiana da quitosana.

Resíduos de pesticidas têm trazido grandes preocupações no que diz respeito à contaminação de solos e recursos hídricos. O uso de agrotóxicos é bastante difundido na agricultura, principalmente no Brasil que é considerado um dos países de maior consumo destes contaminantes. Dessa forma, a biodegradação apresenta-se como uma alternativa ecologicamente viável e eficaz no tratamento de ambientes contaminados por pesticidas.

Segundo Conceição *et al.* (2005), nas últimas décadas, o uso de fungos filamentosos vêm crescendo nos processos de biodegradação em decorrência do alto potencial de degradação, de biossorção e por apresentarem mecanismos de resistência em condições ambientais desfavoráveis.

Diante do exposto, essa pesquisa se propõe a desenvolver biomateriais provindos de resíduos da carcinicultura e utilizar a espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400, que imobilizada nesse suporte, venha a apresentar a capacidade de germinar e biodegradar o pesticida metil paration.

A proposta apresentada neste trabalho é incomum quanto às técnicas utilizadas de imobilização com fungos aeróbios, não havendo nenhuma literatura específica com essa finalidade, o que torna a pesquisa inédita e propícia para futuros estudos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo estudar a aplicabilidade da utilização de quitosana como suporte para a imobilização da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 e sua aplicabilidade na biodegradação de águas contaminadas com pesticida metil paration.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a quitosana comercial obtida a partir da carapaça de camarão.
- Avaliar a resistência do *Aspergillus niger* AN 400 à ação fungicida da quitosana.
- Produzir e caracterizar diferentes suportes (esferas, membranas e filmes) de quitosana visando a imobilização do *Aspergillus niger* AN 400.
- Selecionar o melhor suporte de quitosana a ser utilizado nos estudos de biodegradação de águas contaminadas.
- Avaliar a eficiência do fungo imobilizado em suporte de quitosana em ensaios de biodegradação de águas residuárias sintéticas contendo o pesticida metil paration via reator biológico em batelada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Esse trabalho tem como proposta a produção de suportes derivados de resíduos da carcinicultura, cuja finalidade é imobilizar a espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 visando à biodegradação de águas contaminadas com o pesticida metil paration. Nesse sentido, a literatura apresentada permeia por entre esses diversos temas específicos.

3.1 Carcinicultura no Brasil

A aquicultura, no período de 1961 a 2009, ofereceu maior crescimento entre as atividades de produção animal, com 3,2% ao ano (FAO, 2012). Para tanto, a produção aquícola foi superior a 63,6 milhões de toneladas, o que representa 41,30% dos produtos de origem aquática no ano de 2011. A carcinicultura é uma das principais atividades de aquicultura devido ao elevado valor econômico do produto (FAO, 2012). Atualmente, a produção mundial de camarões atinge cerca de 8 milhões de toneladas e, deste total, 50% é produzido em cativeiro. Esta proporção era inferior a 1% no início dos anos 80. Estes números mostram a importância crescente da carcinicultura nos últimos anos, sobretudo nos países do sudeste asiático, que detêm 82% da produção mundial.

O Brasil apresenta-se como o maior país da América do Sul, contendo uma grande área territorial, sendo privilegiado com uma extensa faixa litorânea de mais de 8 mil quilômetros. Sua posição geográfica favorece o armazenamento de 12% da água doce do planeta. Este cenário dá ao país um grande potencial para atividades aquícolas, seja nas zonas costeiras ou em viveiros de água doce (MATTHIENSEN *et al.*, 2014). Ressalta-se também, que o cultivo de camarões é uma atividade importante não só para a socioeconomia rural e litorânea, como também para vários municípios do nordeste do Brasil. Com o aumento populacional, a crescente demanda por camarões é um ótimo atrativo econômico no mercado nos últimos anos, e tem feito empresários expandirem suas criações e novos investidores se interessarem pela atividade (ABCC, 2012).

Mesmo sendo uma atividade recente no Brasil, a carcinicultura se concentra na Região Nordeste com mais de 99% da produção nacional. O cultivo do camarão permanece, praticamente dentro das fronteiras dessa região. Constata-se a importância dessa atividade como valiosa ferramenta para a geração de emprego e renda nas áreas litorâneas e interioranas, principalmente nos casos onde são insuficientes as opções de produção agrícola

em escala comercial (ABCC, 2013). O potencial da região Nordeste na exploração da carcinicultura em comparação as outras regiões se dá pela vantagem das condições climáticas, como por exemplo, temperatura média adequada aos mais diversos tipos de cultivos, inexistência de invernos prolongados, altas taxas de luminosidade, além de apresentar áreas apropriadas disponíveis.

Nas zonas adjacentes aos manguezais da faixa que se estende do sul da Bahia ao norte do Maranhão, onde a produção agrícola é limitada ou inexistente devido às condições de solos arenosos e água salobra, uma das raras alternativas econômicas que se apresenta é o cultivo do camarão marinho em cativeiro, propiciando a geração de emprego e renda e modificando o quadro de pobreza rural predominante nessas regiões (ABCC, 2003). Contudo, o camarão cultivado se concretiza como líder das exportações do setor pesqueiro nacional e evidencia que pode contribuir para ampliar os superávits da balança comercial, captando divisas efetivas para fortalecer a posição financeira do Brasil no âmbito internacional (FROTA, 2005).

A Tabela 1 mostra o perfil da carcinicultura por regiões do país, indicando que o nordeste brasileiro concentra mais de 99% da produção nacional.

Tabela 1 - A carcinicultura nas regiões brasileiras.

Região	Fazendas		Área de produção em 2011		Produção	
	Nº	%	ha	%	Ton	%
Norte	3	0%	4	0,02%	56	0,01%
Nordeste	1428	92%	19.610	98,81%	69.088	99,3%
Sudeste	1	0,1%	-	-	-	-
Centro-Oeste	-	-	-	-	-	-
Sul	112	7%	233	1,17%	427	0,6%
Total	1544	100%	19.847	100%	69.571	100%

Fonte: ABCC (2013).

Os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte ocupam posição de destaque já que são os dois maiores produtores de camarão cultivado no Brasil que, juntos correspondem por mais de 70% da produção nacional, seguidos pela Bahia, Pernambuco, Piauí, Sergipe, Paraíba, Santa Catarina, Maranhão, Alagoas, Rio Grande do Sul, Pará e Paraná (ABCC, 2013).

Contudo, a experiência acumulada nos países onde a carcinicultura vem apresentando crescimento acelerado tem revelado três aspectos que, por sua importância, merecem destaque: O aspecto econômico (a exploração da atividade de cultivo de camarão pode ser conduzida tanto por pequenos, como por médios e grandes produtores), O aspecto social (o emprego de mão de obra não especializada, representada pelos próprios pescadores artesanais, que apresentam alto índice de marginalização) e o aspecto ecológico (relacionado com a conservação do meio ambiente, uma vez que essa atividade prima e exige excepcionais condições hidrobiológicas). Assim, essa atividade termina sendo uma grande aliada no efetivo controle das condições ambientais, especialmente quando se leva em consideração que o verdadeiro conceito do desenvolvimento sustentável, o qual passa prioritariamente por uma administração responsável dos recursos hídricos, que deve levar em consideração a função produtiva desses ambientes, a geração de emprego e renda, e a conservação ambiental (CAVALCANTI, 2012).

3.2 Resíduos da carcinicultura: impactos e utilidades

Durante o processamento do camarão, por meio da fase de descasque, são originadas grandes quantidades de resíduos, tendo em vista que cabeça e casca do animal correspondem a aproximadamente 40% de seu peso total, sendo tal resíduo composto por cerca de 70 a 75% de água (GILDBERG; STENBERG, 2001). Geralmente, a disposição final deste resíduo é irregular, sendo enterrado ou arremessado no mar ou em rios, ocasionando problemas ambientais, principalmente nos países com pouca ou nenhuma fiscalização.

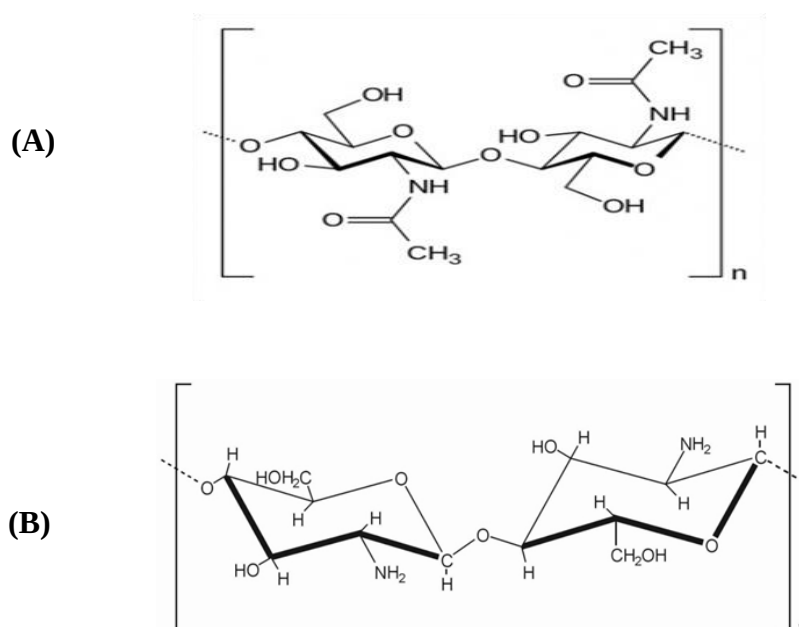
Os resíduos da carcinicultura são compostos basicamente pelo revestimento dos camarões que possuem altos teores de quitina (15-20%), proteínas (25-40%), sais inorgânicos (40-55%) e pigmentos carotenóides (cerca de 15%), é relevante destacar que ao invés de simplesmente descartar estes materiais como lixo, se pode buscar aproveitamento para tais componentes, minimizando os impactos ambientais do acúmulo de tais resíduos. A utilidade do camarão está para além do aspecto econômico da indústria de alimento, também encontra utilidade nas indústrias química, aeronáutica, médica e farmacêutica; na culinária, o camarão fornece a cauda, representando 40% a 60% do total do corpo. A cabeça, casca e apêndices (subprodutos), atualmente também encontram utilidades. Fabrica-se a farinha de camarão com a cabeça, da quitina que forma a casca, se retira um material para a fabricação de colas altamente resistentes, que são utilizadas pela indústria aeronáutica e material odontológico de alta precisão, além de outros produtos (KRAJEWSKA, 2004).

3.3 Quitina e quitosana

A quitina (Figura 1A), denominação usual para o polímero $\beta(1\rightarrow4)$ 2-acetamino-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) é o precursor direto da quitosana, e foi descoberta em cogumelos pelo professor francês Henri Braconnot, em 1811, recebendo a denominação inicial de fungina. Odier, em 1823, denominou de quitina quando esta foi isolada de insetos. Apenas em 1843, Payen descobriu que a quitina continha nitrogênio em sua composição (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 2004). A quitina é considerada, depois da celulose, o biopolímero mais abundante na natureza, estando presente como elemento estrutural em animais invertebrados, em algas diatomáceas, na maioria dos artrópodes e na parede celular de fungos das classes *Ascomycetos*, *Basidiomycetos*, *Deuteromycetos*, e principalmente *Zygomycetes*, ordem *Mucorales* (BERGER, 2013).

A quitosana (Figura 1B) foi descrita pela primeira vez pelo professor Rouget, em 1859, quando este pesquisador colocou em ebulição uma solução de hidróxido de potássio com quitina (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 2004). A quitosana é um polissacarídeo biodegradável, hidrofílico, atóxico e biocompatível que apresenta um interesse econômico notável devido à sua versatilidade funcional, com diversas aplicações em potencial. É um biopolímero de baixo custo, abundantemente disponível para a remoção de poluentes que podem ser obtidos a partir de recursos naturais (MUZZARELLI *et al.*, 2012).

Figura 1 - Estruturas químicas genéricas da quitina (A) e da quitosana (B).



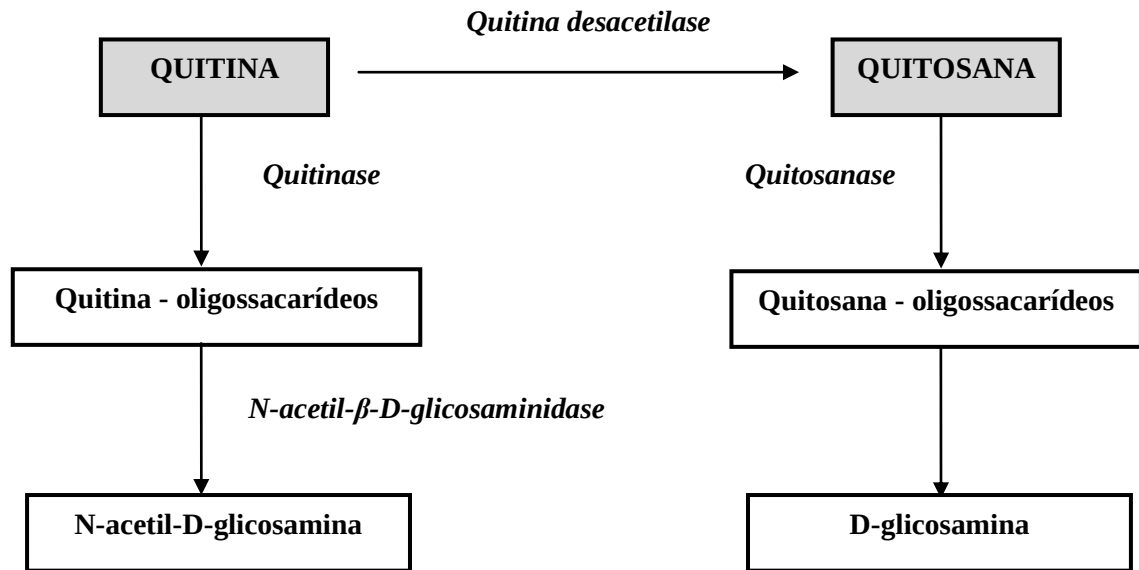
Fonte: Kumar (2000).

O procedimento mais empregado na aquisição de quitosana envolve a reação de desacetilação da quitina com NaOH (40%) a 120 °C por quase 3 horas. Para a produção de 1 kg de quitosana com grau de desacetilação de 70%, a partir da casca de camarão, são necessários 6,3 kg de HCl, 1,8 kg de NaOH e cerca de 1.400L de água. O rendimento da quitina é de aproximadamente 10% em termos de resíduo seco de cascas de crustáceos (KUMAR, 2000; GILDBERG; STEMBERG, 2001). Vale ressaltar que antes da etapa de desacetilação, a quitina passa por outros processos que envolvem desproteinização em NaOH diluído, descalcificação em HCl diluído e despigmentação em acetona (KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana é naturalmente encontrada na parede celular de fungos, principalmente aqueles da classe *Zygomycetes* (BERGER, 2013) que podem apresentar até 50% deste polímero na sua estrutura (ZAMANI *et al.*, 2010). Logesh *et al.* (2012) indicam o fungo *Aspergillus niger* como um promissor micro-organismo produtor de quitosana. Os autores observaram que *Aspergillus niger* cultivado em meio batata dextrose, sem e com diferentes concentrações de glicose de 2 a 12%, e em 12 dias exibiu maior produção de quitosana equivalente a 1,34 g/L. Entretanto, o maior rendimento desse biopolímero (1,93 g/L) foi obtido com esse fungo cultivado em meio BD acrescido de 10% glicose. Os autores relataram ainda que a presença de glicose no meio de cultivo influencia a produção de quitosana e que o crescimento desse fungo e a produção de quitosana foram favorecidos com o aumento da concentração de glicose no meio. Além de sugerir que as condições de cultivo influenciam a produção desse biopolímero.

Para estes materiais, o grau de acetilação indica a proporção de unidades de N-acetil-D-glucosamina em consideração ao número total de unidades. Isto permite distinguir a quitina da quitosana. Para a quitosana, o grau de acetilação é inferior a 50%. Este valor também determina o limite de solubilidade do polímero em soluções ácidas diluídas ($2 < \text{pH} < 6$) (CHATELET *et al.*, 2001 *apud* CARVALHO, 2006). Para que a quitina e a quitosana sejam biodegradadas sem acumulação excessiva na natureza, outras três enzimas (quitinase, quitosanase e N-acetil- β -D-glicosaminidase) atuam juntas na redução dos polímeros às unidades monoméricas constituintes, o que caracteriza o ciclo da quitina (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo da quitina.



Fonte: Adaptado de Dallan (2005).

Entre as bactérias produtoras de quitosanase, destacam-se os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, enquanto que entre os fungos o mais citado tem sido o gênero *Aspergillus* (CHENG; LI, 2000).

Dentre as diversas aplicações da quitosana destacam-se: o tratamento de rejeitos industriais; a clarificação de sucos através da remoção de corantes; a composição de produtos para higiene pessoal e cosméticos em geral. Na agricultura, pode ser usada como protetora de sementes, pois apresenta propriedade bactericida e fungicida, além de reter umidade e nutrientes. Na indústria papelreira, a quitosana forma filmes, aumenta a resistência e a impermeabilidade do papel. É também usada na curtição e no acabamento da fabricação de artefatos de couro. Além disso, sua eficiência foi comprovada na confecção de biomateriais do tipo: membranas renais, pele artificial, lentes de contato, entre outros. A quitosana é aplicada na forma de bandagens que, além de protegerem contra bactérias, promovem uma rápida cicatrização e estancam sangramentos. Também auxilia na redução de peso em tratamentos de obesidade, através da captura das gorduras contidas nos alimentos (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 2004).

É válido ressaltar, também, que a farta disponibilidade de quitosana e ou de seus produtos, simula uma opção interessante para uso como suporte para imobilização de micro-organismos, devido às características típicas desse polímero: ser biodegradável, possuir ação lipofílica, formar gel e esferas e a capacidade passar por processos de reticulação (ATLAS, 1995 *apud* CARVALHO, 2006).

Dentre as mais recentes linhas de pesquisa sobre quitosana apresenta-se o desenvolvimento de suportes para imobilização de células, fármacos e biomoléculas. Neste contexto, o polímero é utilizado como matéria prima no desenvolvimento de membranas, filtros e microesferas, os quais podem ser utilizados em diversos ramos da biotecnologia (GUIBAL; VINCENT; SPINELLI, 2005).

A utilização de micro-organismos na biodegradação de produtos químicos tóxicos abriu campo de aplicação para a quitina e a quitosana na área de purificação e tratamento de água. Esses biopolímeros são usados como matrizes para imobilização bactérias envolvidas na desintoxicação e biodegradação de vários micropoluentes orgânicos, como a exemplo dos clorofenóis (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 2004).

3.4 Atividade antimicrobiana da quitosana

A quitosana apresenta maior espectro de ação antimicrobiano que a quitina. Essa diferença se deve ao maior número de aminas livres presentes na quitosana que podem interagir fortemente com sítios negativos da superfície celular, inibindo o crescimento microbiano (GIL *et al.*, 2004). Segundo Lim e Hudson (2003) os fatores que afetam diretamente a atividade antimicrobiana da quitosana são o grau de desacetilação, a massa molecular, o pH e a temperatura, que atuam modificando a estrutura química do polímero e, consequentemente, o potencial de ligação às membranas celulares.

A atividade antimicrobiana da quitosana provavelmente ocorre por sua atuação nas membranas celulares dos micro-organismos, conforme Liu *et al.* (2004) que estudaram o efeito de soluções de quitosana nas membranas celulares e concluíram que as soluções de quitosana aumentam a permeabilidade das membranas externa e interna, podendo rompê-las e liberar os conteúdos celulares.

No que diz respeito ao potencial antifúngico da quitosana, vários estudos foram realizados para o tratamento de fitopatologias causadas por fungos presentes no solo. Tais estudos decorrem ao fato da quitosana inibir o crescimento da maioria dos micro-organismos resistentes aos fungicidas (LIM; HUDSON, 2003). Conforme descrito por Rabea *et al.* (2003) a quitosana na concentração de 1 mg.mL^{-1} inibiu o crescimento de vários fungos, com exceção dos zigomicetos, pois este grupo apresenta o biopolímero como principal constituinte da parede celular.

3.5 Imobilização celular

Imobilização é o termo comum empregado para apresentar diversas formas de fixação de células ou moléculas em suportes poliméricos. Conforme Bickerstaff (1997) os principais tipos de imobilização incluem: adsorção a superfícies, ligação covalente a carreadores, encapsulamento, aprisionamento em matrizes e ligação cruzada entre células (Figura 3).

Figura 3 - Principais métodos de imobilização de células microbianas.



Fonte: Adaptado de Bickerstaff (1997).

Diversos polímeros são utilizados como suporte para imobilização celular. Polissacarídeos de algas como agar, agarose, alginatos e carragenanas são classificados como polímeros naturais, enquanto poliacrilamida, poliestireno, poliuretano e alumina, como polímeros sintéticos (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996). O uso dos polímeros naturais pode ser realizado na forma de matrizes homogêneas ou condensados com outros reagentes, por exemplo, com o glutaraldeído (agente reticulador). A preferência por esses polissacarídeos reside no fato deles serem abundantes na natureza, economicamente viáveis e apresentarem baixa toxicidade, se comparados aos de origem sintética (DIAS; REZENDE; LINARDI, 2000; JIALONG *et al.*, 2001; CRINI, 2005).

O aprimoramento e o desenvolvimento de novas técnicas de imobilização celular, associadas ao uso de novos materiais como suporte, têm permitido que os processos de degradação com células imobilizadas fossem realizados em condições adversas de pH, de esterilidade e agitação (JUNTER; JOUENNE, 2004). No caso do uso de fungos filamentosos, estes que possuem uma taxa de crescimento mais lenta quando comparada à maioria das espécies de leveduras, a imobilização celular é capaz de reduzir os custos de produção (DIAS *et al.*, 2010).

Algumas pesquisas sobre quitosana dizem respeito ao desenvolvimento de suportes para imobilização de células, fármacos e biomoléculas. Dessa forma, o polímero é utilizado como matéria-prima no desenvolvimento de membranas, filtros e esferas os quais podem ser utilizados em diversos ramos da biotecnologia (GUIBAL *et al.*, 2005). Apesar das excepcionais propriedades da quitosana, poucos são os trabalhos que relatam o uso desse polímero para a imobilização de células. Isso provém, possivelmente, da reconhecida atividade antimicrobiana da quitosana, o que dificulta o aprisionamento de células viáveis (LIU *et al.*, 2004).

A quitosana pode ser utilizada como suporte de imobilização na forma de esferas, membranas e filmes. A imobilização em esferas apresenta vantagens comparadas a células somente adsorvidas em matrizes, como o fato de proteger os micro-organismos contra os efeitos tóxicos dos poluentes que possam estar no meio, facilitar a manipulação celular e diminuir a competição com a microbiota local (KRAJEWSKA, 2004; CARVALHO, 2006). Suas propriedades de floculação e coagulação fazem com que a quitosana seja bastante utilizada na remoção de sólidos suspensos, turbidez e até para a separação seletiva de proteínas (GUO *et al.*, 2005). Também pelo fato de ser economicamente viável, se destaca dentre outros absorventes típicos, tais como o carvão ativado, para a remoção de compostos orgânicos e corantes de águas residuárias, assim como a remoção de poluentes de águas residuais da criação de peixes (CHEN *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2005).

Vale destacar que a quitosana é insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, sendo solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6,0. O ácido acético e o ácido fórmico são os mais usados para dissolver o biopolímero. Em adição, dispersões de quitosana também podem ser preparadas por dissolução em ácidos inorgânicos diluídos, tais como os ácidos nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico (DAMIAN *et al.*, 2005).

Outra opção para imobilização de micro-organismos é o desenvolvimento de membranas e filmes, que são preparados secando uma solução de quitosana em ácido à temperatura ambiente por 30-36 h e espalhando a solução na superfície de um recipiente de vidro. Filmes de quitosana também são preparados por secagem no forno e por infravermelho. Dependendo do método de secagem e dos incrementos adicionados aos filmes e membranas, suas propriedades físicas como tensão de ruptura, alongamento e módulo de elasticidade, ou módulo de Young são alteradas (SRINIVASA *et al.*, 2004).

Muitos dos métodos apresentados na literatura para obtenção de derivados estruturais da quitosana requerem a reticulação das cadeias poliméricas desse biopolímero, estratégia que confere às quitosanas modificadas propriedades interessantes, tais como, maior resistência à dissolução em meio ácido, menor hidrofília, geração de estruturas poliméricas densas ou porosas e redução da reatividade química do material preparado. Para essas novas propriedades, aplicações mais específicas podem ser vinculadas à quitosana: fabricação de resinas para extração em fase sólida de íons metálicos, corantes e poluentes orgânicos, desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos e construção de biossensores baseados na imobilização de enzimas ou de células vivas em filmes de quitosana reticulada (GONSALVES *et al.*, 2011).

Segundo Baroni *et al.* (2008), a reticulação com glutaraldeído e epicloridrina é um exemplo típico de modificação estrutural mediada por produto químico. Esta reação é realizada para evitar a dissolução em soluções ácidas ou para melhorar as propriedades de adsorção.

Estudos realizados por Carvalho (2006) desenvolveram produtos a base de quitosana contendo bactérias imobilizadas para fins de biodegradação de ambientes contaminados com petróleo e metais traços. Gomes (2007) investigou a imobilização de esporos bacterianos da linhagem de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana para uso na biodegradação de hidrocarbonetos encontrando biorremediações superiores a 98%.

3.6 Biodegradação

De acordo com Soares *et al.* (2011), a biodegradação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos (micro-organismos e plantas), que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando assim, contaminantes em substâncias inertes.

A biodegradação tem como finalidade explorar os processos degradativos que ocorrem naturalmente limpando assim, os locais poluídos. Na biodegradação *in situ*, o tratamento é realizado no próprio local poluído e na biodegradação *ex situ*, ocorre a retirada do material contaminado para outra área a fim de tratá-lo (MAIER, 2000). Apesar de existirem várias tecnologias que empregam processos físicos e/ou químicos para a descontaminação de ambientes poluídos, o processo biológico de biodegradação é uma alternativa ecologicamente mais apropriada e eficaz no tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). A constituição de leis internacionais que regulam a demanda do gerenciamento ambiental, aliada à pressão por parte da opinião pública e de governos, trouxe grande empenho dedicado ao desenvolvimento de tecnologias mais limpas para o tratamento de resíduos e a remediação de ambientes contaminados (BRITO *et al.*, 2004).

Conforme a Resolução 314, de 29/10/2002 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) se entende por remediador o produto, constituído ou não por micro-organismos, destinados à recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados, tratamento de efluentes e resíduos, desobstrução e limpeza de dutos e equipamentos, atuando como agente do processo físico, químico, biológico ou combinados. A Resolução estabelece que os remediadores sejam registrados no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), no sentido de serem produzidos, importados, comercializados e utilizados, dispensando de registro àqueles destinados à pesquisa e experimento necessitando da aprovação deste órgão.

O mais viável processo metabólico na biodegradação de moléculas xenobióticas (moléculas estranhas ao ambiente natural) recalcitrantes (moléculas de difícil degradação) é o realizado por micro-organismos, pois estes desempenham a tarefa de reciclar a maioria das moléculas da biosfera e participam dos principais ciclos biogeoquímicos, representando, portanto, o suporte de manutenção da vida na Terra (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

A degradação do poluente é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por micro-organismos. O oxigênio atua usualmente comoceptor final de elétrons, portanto a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular é denominada de respiração aeróbia heterotrófica. Contudo, quando há ausência do oxigênio os micro-organismos podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons, tais condições são chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer por desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou em condições metanogênicas (CORDAZZO, 2000).

3.6.1 O uso de micro-organismos na biodegradação

O uso de fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biodegradação vêm crescendo, esse interesse acontece em decorrência do alto potencial degradativo, bioassortivo (metais e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005). Existe uma série de características que tornam os fungos importantes na aplicação em sistemas de biodegradação, com destaque para: capacidade de crescer sob as condições de estresse ambiental que podem limitar o crescimento bacteriano, o modo de crescimento, induzido quimioestaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, por meio do alongamento e ramificação das suas hifas, que permitem a colonização de grandes áreas e por fim o sistema de biodegradação realizado por enzimas extracelulares. Nesse contexto, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (CHANDER; ARORA; BATH, 2004).

Para a escolha de um micro-organismo que poderá ser potencialmente utilizado na remediação de uma área contaminada, necessita-se identificar sua capacidade em degradar o contaminante alvo e o tempo necessário para que isso ocorra (GEERDINK *et al.*, 1996). A capacidade dos micro-organismos em degradar compostos orgânicos trouxe reconhecimento da comunidade científica, e dessa forma, esses organismos vêm sendo utilizados ao longo do tempo em processos de tratamento biológico de efluentes líquidos e de resíduos sólidos. Por conta dessa capacidade, têm sido desenvolvidos processos biotecnológicos, dentre os quais se destacam a degradação de poluentes, lixiviação de minerais, desobstrução de poços de petróleo e recuperação de locais contaminados: o solo, águas superficiais e subterrâneas. Esses micro-organismos podem ser encontrados no próprio ambiente impactado, sendo, na maioria das vezes os responsáveis pelo desaparecimento dos contaminantes (OLIVEIRA, 2005).

Diversos fungos e bactérias vêm sendo usados na remoção de metais pesados de efluentes industriais e do ambiente. É sabido que um grande número de compostos ligantes de metais é produzido por estes micro-organismos, tais como os ácidos orgânicos simples, alcoóis e macromoléculas, polissacarídeos, ácidos húmico e fúlvico (SAYER; GADD, 2001). Além disso, esses micro-organismos podem adsorver estes metais a componentes presentes na superfície da parede celular (processo denominado biossorção), bioacumulá-los em organelas ou ligá-los a proteínas de seu interior celular (MELO; AZEVEDO, 2008).

Também têm sido utilizados muitos micro-organismos na degradação de gasolina, óleo Diesel e resíduo de petróleo oriundo de derramamentos nos oceanos ou no solo. Dentre os hidrocarbonetos que compõem estes resíduos, os mais tóxicos e preocupantes são os chamados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e os três isômeros de posição do xileno) (TEIXEIRA, 2007).

Em pesquisa realizada por Teixeira (2007) sobre a degradação de gasolina comercial por bactérias das espécies *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* foram relatados resultados significativos de degradação.

Neste contexto diversos gêneros de bactérias têm sido apontados como potenciais degradadoras de ambientes contaminados por petróleo, destacando-se: *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* *Vibrio* (JACQUES *et al.*, 2007; SEO *et al.* *apud* TONINI; REZENDE; GRATIVO, 2010).

Contudo, é importante ressaltar que muitos micro-organismos têm sido usados na degradação destes compostos em solos ou em efluentes. Assim pode-se citar diversas bactérias, como espécies de *Nocardia*, *Pseudomonas* e agrobactérias (YANZE-KONTCHOU; GSCHWIND, 1994); e dentre os fungos filamentosos, o *Aspergillus fumigatus* e o *Rhizopus stolonifer* (BEHKI *et al.*, 1993).

3.7 Fungos: a espécie *Aspergillus niger*

Os fungos são considerados organismos eucarióticos e heterotróficos, na sua maioria aeróbios, produzem longos filamentos chamados hifas cujo conjunto forma uma massa denominada micélio. São elementos significantes da microflora do solo, vivem também nos vegetais e na água. Espalham-se vastamente pela natureza, consequência da produção de elementos de disseminação – os propágulos, sendo o ar atmosférico uma das vias de disseminação (SAMPAIO, 2005). São organismos saprófitos e obtêm o seu alimento a partir da degradação da matéria orgânica morta. A maioria é de vida livre e podem ser classificados em grupos, tais como fungos filamentosos e leveduras (MORE *et al.*, 2010).

Durante muitos anos, os fungos foram considerados vegetais, no entanto, a partir do ano de 1969 passaram a ser classificados como um novo reino – Reino *Fungi*. Essa

classificação se deu por apresentarem características particulares, tais como: não sintetizar clorofila, não possuir celulose na sua parede celular (exceto alguns fungos aquáticos), não armazenar amido como substância de reserva, conter substâncias quitinosas nas paredes e capacidade de depositar glicogênio, dessa forma eles foram classificados como sendo diferentes das plantas. Os fungos, especialmente o *Aspergillus niger* apresentam todas estas características básicas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Os fungos são considerados os agentes mais importantes de degradação na Terra (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Também são biodegradadores eficientes de polímeros de plantas naturais, como lignina e celulose, porém degradam outros tipos de moléculas orgânicas, tais como: ceras, borrachas, fenol, benzeno, tolueno, xileno e xenobióticos incisivos em ecossistemas florestais, onde eles são os principais decompositores da matéria orgânica que impregna as células, as fibras e os vasos do vegetal, tornando-os assim, impermeáveis e inextensíveis (SAMPAIO, 2005).

Conforme Esposito e Azevedo (2010) o metabolismo dos fungos é idêntico ao das plantas, porém os fungos não são fotossintéticos e podem metabolizar uma grande variedade de fontes de carbono, incluindo açúcares e óleos. Independente de seu modo de nutrição, os fungos devem absorver os nutrientes necessários para seu crescimento em um substrato disponível, tais nutrientes devem possuir um tamanho adequado para que possam assim cruzar as camadas celulares até alcançar o citoplasma onde serão metabolizados.

O emprego de fungos filamentosos no tratamento de águas residuárias é devido ao seu grande potencial de biodegradação, sendo, de acordo com Lemos *et al.* (2008), pontos importantes: o crescimento micelial, que oferece vantagem na colonização de substratos insolúveis, ocorrendo a excreção de enzimas extracelulares que degradam o substrato; maior tolerância a concentrações altas de produtos tóxicos, sendo também capazes de crescer sob condições adversas (pH baixo, escassez de nutrientes, ambientes com umidade relativa baixa).

Segundo Griffin (1994), determinados elementos presentes no meio são indispensáveis para o crescimento dos fungos, tais como: micronutrientes, em concentrações iguais ou inferiores a 10^{-6} mol/L e macronutrientes em concentrações de 10^{-3} mol/L. Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os elementos minerais essenciais aos fungos.

Tabela 2 - Macronutrientes minerais essenciais aos fungos.

Elemento	Fonte	Concentração (M)	Função
Enxofre	K ₂ SO ₄	10 ⁻⁴	Constituinte de aminoácidos (metionina; cisteínas; cistina).
Fósforo	KH ₂ PO ₄	10 ⁻³	Composição de ácidos nucleicos; transferência de energia; metabolismo intermediário.
Nitrogênio	NaNO ₃ ; NH ₄ Cl	10 ⁻³	Constituinte de aminoácidos; nucleotídeos e vitaminas.
Magnésio	MgCl ₂ ; MgSO ₄	10 ⁻³	Ativação enzimática; metabolismo de ATP.
Potássio	KCl; K ₂ HPO ₄	10 ⁻³	Atividade enzimática; metabolismo de carboidratos; balanço iônico.
Cálcio	CaCl ₂	10 ⁻⁴ e 10 ⁻³	Ativador enzimático; estrutura de membranas não universalmente requerida.

Fonte: Griffin (1994).

Tabela 3 - Micronutrientes minerais essenciais aos fungos.

Elemento	Fonte	Concentração (M)	Função
Ferro	FeCl ₃ ; FeSO ₄	10 ⁻⁶	Constituinte de citocromo.
Cobre	CuSO ₄	10 ⁻⁶ a 10 ⁻⁷	Atividades enzimáticas; biossíntese de pigmentos.
Manganês	MnCl ₂	10 ⁻⁷	Ativador de enzimas; atração na síntese de ácidos nucleicos.
Zinco	ZnCl ₂	10 ⁻⁸	Ativação enzimática; metabolismo intermediário dos ácidos nucleicos.
Molibidênio	Na ₂ MoO ₄	10 ⁻⁹	Ativação enzimática; metabolismo de nitratos.

Fonte: Griffin (1994).

A espécie fúngica estudada neste trabalho foi o *Aspergillus niger*, por possuir eficiência comprovada na degradação de compostos recalcitrantes e remoção de DQO (MIRANDA *et al.*, 1996; VASSILEV *et al.*, 1997; GARCÍA *et al.*, 2003 *apud* FELIX *et al.*, 2006).

O *Aspergillus* foi catalogado em 1729, pelo padre italiano e biólogo Pietro Antonio Micheli que ao observar o fungo no microscópio, associou-o a forma de um *aspergillum* (borrifador de água santa) e nomeou a espécie de acordo com o objeto. As

espécies de *Aspergillus* são aeróbias e encontradas em ambientes ricos em oxigênio, onde geralmente crescem na superfície em que vivem, contaminando restos de comidas (como pães e batatas) e também em muitas plantas e árvores.

O *Aspergillus niger* é uma das espécies fúngicas mais comuns do gênero *Aspergillus*. Ela provoca doença chamada mofo preto em algumas frutas e vegetais, como uvas, cebolas e amendoim, e é um contaminante comum de alimentos. Ele é ausente no solo e frequentemente notificado em ambientes internos, onde suas colônias pretas podem ser confundidas com os de *Stachybotrys* (espécies também chamadas de “bolor negro”) (MILLER, 2001 *apud* SOUZA NETO, 2012).

O *Aspergillus niger* apresenta a seguinte classificação: Divisão – Eumycota; Classe – Ascomycetos, sendo considerado como fungo de decomposição branda ou mole, pode ainda degradar a lignina e polissacarídeos, mas com velocidades muito baixas. Está entre os micro-organismos mais importantes na indústria da biotecnologia, principalmente em aplicações agroalimentares. A espécie é conhecida por secretar uma variedade de enzimas hidrolíticas com capacidade de degradar açúcares. A enzima produzida depende do tipo de substrato da fermentação (TSANG *et al.*, 2009).

De acordo com Eggen e Majcherczyk (1998), os fungos filamentosos são os mais eficientes na produção de enzimas extracelulares oxidativas (proteases, celulasas, ligninases, lactases, dentre outras). O *Aspergillus niger* tem eficiência comprovada na degradação de compostos recalcitrantes em efluentes da indústria farmacêutica, indústria de azeite de oliva, indústria de castanha de caju, cervejarias, refinarias de petróleo e em água para remoção do pesticida agrícola paration (FÉLIX *et al.*, 2006; FREITAS NETO *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ *et al.*, 2006; MIRANDA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2006; VASSILEV *et al.*, 1997).

3.8 A contaminação ambiental por pesticidas

Na Legislação Brasileira (Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, publicado no DOU, de 08 de janeiro de 2002), os pesticidas são denominados de “agrotóxicos” e classificados como inseticidas, fungicidas e herbicidas, dentre outros. A denominação pesticida é dada à substância ou à mistura de substâncias destinadas a prevenir a ação ou destruir insetos, ácaros, roedores, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida, sejam elas animal ou vegetal, prejudiciais à lavoura (SANTISTEBAN, 1999).

O uso de agrotóxicos é tido como prática comum para o controle de diversas pragas e tem como finalidade aumentar a produção e melhorar a qualidade dos produtos. Vale ressaltar que grande parte desses objetivos foi alcançada ao longo dos anos, mas a utilização pouco criteriosa desses compostos vem causando a contaminação de organismos alvos e não alvos e, conseqüentemente, do meio ambiente (COUTINHO *et al.*, 2005).

Os agrotóxicos, quando em contato com o solo, a água e o ar podem persistir nesses ambientes e assim, se acumularem no solo e na biota. Seus resíduos podem ser carregados para as águas superficiais por escoamento e para as águas subterrâneas por lixiviação (DORES; FREIRE, 2001). Dessa forma, essas substâncias podem intoxicar vários organismos e causar danos à saúde humana através da ingestão de água e alimentos contaminados (DOMINGUES *et al.*, 2004).

Dentre todos os acontecimentos de impactos sobre organismos específicos, os seres humanos são os mais afetados, pois além da contaminação das águas e do solo, existe o impacto direto na biodiversidade que interfere na qualidade de vida humana. Também existem resíduos presentes nos alimentos e na água potável, fatores que podem tornar-se carcinogênicos (RIBAS; MATSUMARA, 2009). Os pesticidas podem ser considerados como um dos contaminantes mais perigosos ao meio ambiente, não apenas por sua toxicidade, mas também podem se bioacumular, além de participar de processos químicos, físicos e biológicos (KOUZAYHA *et al.*, 2012).

A segunda principal causa de intoxicação no Brasil é originada de agrotóxicos, sendo a primeira causa por medicamentos. Contudo, a morte dos intoxicados ocorre em sua maioria entre os que tiveram contato com agrotóxicos (ANVISA, 2009). No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e no controle de parasitas, e depois, a partir da década de 70, na agricultura, tendo incentivo do Plano Nacional de Desenvolvimento (PND). Desde então, os pesticidas têm sido largamente utilizados na agricultura, e o Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos (DAMS, 2006).

Entre 2001 e 2008, a venda de venenos agrícolas no Brasil saltou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões, correspondendo a 986,5 mil toneladas de agrotóxicos aplicados, levando o país a atingir a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos. Em 2009, o consumo foi ampliado ainda mais, ultrapassando a faixa de 1 milhão de toneladas (LONDRES, 2011). Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria de Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), entre 2000 e 2010 o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190% enquanto o mercado

mundial cresceu 93% (CARNEIRO *et al.*, 2012). Em 2011, existiam cerca de 370 ingredientes ativos registrados no Brasil para uso agrícola, pertencentes a mais de 200 grupos químicos diferentes, dando origem a 1.458 produtos formulados para venda no mercado (LONDRES, 2011). Em 2012, esse número aumentou, correspondendo a aproximadamente 434 ingredientes ativos e 2.400 formulações de agrotóxicos registrados no MS, MAPA e MMA, os quais são permitidos no Brasil de acordo com os critérios de uso e indicação (CARNEIRO *et al.*, 2012). O Brasil tem se tornado ainda refúgio de agroquímicos proibidos em outras partes do mundo. Dos 50 pesticidas mais utilizados nas lavouras do país, 22 são proibidos na União Europeia (CARNEIRO *et al.*, 2012).

É importante lembrar que sem as devidas precauções e cuidados em relação à manipulação, produção, estocagem e destino final dos pesticidas, não só o meio ambiente corre risco, mas também a saúde das pessoas que, de alguma forma, entram em contato com esses produtos (DAMS, 2006). A utilização desses agentes químicos acarreta a contaminação de grãos, frutas, legumes, hortaliças e verduras, trazendo malefícios ao meio ambiente, produtores rurais e aos consumidores (CISCATO, 2008). Além disso, a presença desses produtos nos mananciais dificulta o tratamento da água, necessitando de tecnologias diferentes daquelas até então empregadas (FERNANDES NETO; SARCINELLI, 2009).

A Tabela 4 apresenta os principais efeitos da intoxicação aguda e crônica causada pela exposição aos principais pesticidas.

Tabela 4 - Efeitos a saúde causados pela exposição a pesticidas.

Classificação	Grupo Químico	Intoxicação Aguda	Intoxicação Crônica
Inseticidas	Organofosforados e carbamatos	Fraqueza; cólica abdominal; vômito; espasmos musculares; convulsão.	Efeitos neurológicos retardados; alterações cromossomiais; dermatites de contato; carcinogênicos.
	Organoclorados	Náusea; vômito; contrações musculares involuntárias.	Arritmias cardíacas; lesões renais; neuropatias periféricas; carcinogênicos; mutagênicos; teratogênese.
Fungicidas	Ditiocarbamatos	Tonteira; vômito; tremores musculares; dor de cabeça.	Alergias respiratórias; dermatites; Doença de Parkinson; cânceres.
	Fentalamidas Dinitrofenóis e Pentaclorofenol	Dificuldade respiratória; hipertemia; convulsão.	Teratogênese; cânceres; cloroacnes.
Herbicidas	Fenoxiacéticos	Perda de apetite; enjojo; vômito; fasciculação muscular.	Indução da produção de enzimas hepáticas; cânceres; teratogênese.

Fonte: WHO (1990); OPS/WHO (1996) *apud* PERES (1999).

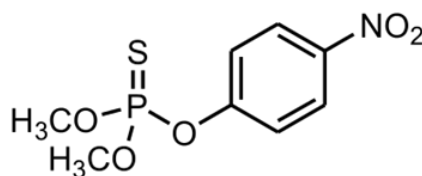
É importante observar que os efeitos agudos são aqueles que resultam da exposição a concentrações de um ou mais agentes tóxicos capazes de causar dano efetivo aparente num período de 24 horas e, os efeitos crônicos são aqueles que resultam da exposição continuada a doses relativamente baixas de um ou mais produtos (RIBAS; MATSUMARA, 2009).

Ao usar produtos sintéticos, como é o caso dos pesticidas, o homem tem contaminado ecossistemas em consequência da fácil dispersão desses produtos e de sua longa permanência no meio ambiente (MOREIRA *et al.*, 2002). Outra forma é a contaminação indireta que pode ocorrer em decorrência de chuvas fortes e erosão nos solos tratados ocasionando a movimentação dos pesticidas para outras áreas (YANG *et al.*, 2006). Também podem ser volatilizados e dispersos pelo vento ou lixiviados e assim, serem transportados através da atmosfera e do solo (GONZALEZ *et al.*, 2005).

3.9 O pesticida metil paration

O metil paration ($C_8H_{10}NO_5PS$), também conhecido como paration-metílico ou *parathion* é um inseticida e acaricida organofosforado com rápido efeito sendo recomendado no combate a uma série de pragas sugadoras (pulgão, tripés, percevejos, ácaro vermelho dentre outras) e mastigadoras (lagartas, besouros, brocas, vaquinhas, mosca das frutas, bicudo do algodão, etc). É quimicamente chamado de tiofosfato de dimetil paranitrofenila. Possui coloração amarelada, é solúvel em solventes orgânicos e inflamável (LARINI, 1999). O metil paration (*O,O*-dimetil-*O*-(*p*-nitro-fenilfosforotioato) (Figura 4) é um dos pesticidas organofosforados mais usados em todo o mundo, especialmente no cultivo de frutas e hortaliças.

Figura 4 - Estrutura química do metil paration.



Fonte: Dórea e Lopes (2004).

O metil paration é altamente tóxico principalmente para os organismos não-alvo. Seu uso é restrito ou proibido em vários países, inclusive existem propostas de bani-lo totalmente (FEE; GARD; YANG, 2005). As concentrações usuais são soluções de 0,05% a 0,1%. (MOORCRAFT *et al.*, 1991). Apresenta classificação toxicológica I e ingestão diária aceitável (IDA) de 0,003 mg/kg de peso corpóreo (MENEZHINI, 2006; LUVIZOTTO-SANTOS, 2009). A degradação do paration conduz a outros subprodutos solúveis em água (METCALF, 1991). A Tabela 5 mostra algumas propriedades físico-químicas do metil paration.

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas do metil paration.

Propriedade	Valor
Peso molecular	263,23 g/mol
Solubilidade em água a 25 °C	50 mg/L
Ponto de fusão	37-38 °C
Densidade a 20 °C	1,358 g/L

Fonte: Maynard (1996).

O metil paration é uma substância termicamente instável e decompõe-se rapidamente em ambiente com valores de pH maiores de 8,0. Em pH de 1 a 5 e a 20 °C, seu tempo de meia-vida é de 175 dias (HERTEL, 1993). Quando grandes concentrações de metil paration atingem o solo, a degradação pode ocorrer por muitos anos (WAUCHOPE, 1992).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará (PADETEC), nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LBA), localizado no campus da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os experimentos foram realizados em cinco etapas: caracterização da quitosana comercial, teste de resistência do *Aspergillus niger* AN 400 à ação fungicida da quitosana, produção dos suportes, com e sem a espécie fúngica imobilizada, seleção e caracterização do suporte a ser utilizado nos ensaios de biodegradação e ensaios de biodegradação de metil paration.

4.1 Identificação da quitosana comercial

A quitosana comercial utilizada (Figura 5) na pesquisa foi fornecida pela Empresa Polymar sediada em Fortaleza-Ceará. Na Tabela 6 são apresentadas algumas especificações comerciais da quitosana comercial utilizada relatadas por Gomes (2007).

Figura 5 - Quitosana comercial em pó utilizada na pesquisa.



Fonte: Autor (2015).

Tabela 6 - Especificações comerciais da quitosana comercial.

Nome químico	Poli-2-deoxi-2-amino-glucose
Natureza química	Polímero linear combinado por ligações β -(1-4)-glicosídica
Fórmula química	$(C_6H_{11}O_4N)_n$
Massa molecular	Monômero (161 Da); Polímero (60.000 – 300.000 Da)
Método de fabricação	Desacetilação da quitina

Fonte: Adaptado de GOMES (2007).

4.2 Caracterização físico-química da quitosana comercial

Nesta parte do trabalho estão descritas as principais metodologias de caracterização da quitosana comercial em pó.

4.2.1 Perda por dessecação

Na determinação da umidade foram pesados 500 mg de quitosana em uma cápsula previamente seca e tarada. Em seguida, a amostra foi seca em estufa por 3 a 4 horas, a 105 °C ± 4 °C. Após retirada da estufa, a mesma foi resfriada em um dessecador por 1 hora e pesada. O cálculo da umidade foi realizado a partir Equação 1 (USP 23, 1995).

$$\% = (P-Q)/P \times 100 \quad (1)$$

Onde: P = peso inicial da quitosana (g) e Q = peso da quitosana seca (g).

4.2.2 Determinação do pH

Para determinar o pH da quitosana, 1 g da mesma foi misturado com 100 mL de água destilada em Erlenmeyer de 250 mL. A solução foi homogeneizada por aproximadamente 15 minutos e o pH medido em um potenciômetro *Misura Line* Modelo ML 1010) calibrado com tampões pH = 4,0 e pH = 7,0 (USP 23,1995).

4.2.3 Resíduo de ignição (Cinzas)

Para a determinação do teor de cinzas foi pesado 1 g de quitosana pulverizada em cadinho seco e tarado e, logo após, a amostra foi incinerada em mufla a 600 °C durante 3 horas. Após esse processo, a mesma foi resfriada em um dessecador durante 1 hora e, posteriormente, pesada. O cálculo do valor do teor de cinzas foi realizado de acordo com a Equação 2 (USP 23, 1995).

$$(\%) \text{ Cinzas} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) \times 100\% \quad (2)$$

4.2.4 Grau de desacetilação

Para a determinação do grau de desacetilação da quitosana cerca de 0,5 a 1 g de quitosana foram diluídas em 30 a 60 mL de HCl 0,1 M à temperatura ambiente. Nessa solução foram acrescentadas gotas de solução aquosa de alaranjado de metila 0,1%. Em seguida, o meio foi titulado em potenciômetro, com hidróxido de sódio 0,1 M, até atingir coloração vermelha (pH = 3,1) ou amarela (pH = 4,4). O cálculo foi realizado a partir da Equação 3 (DOMARD; RINAUDO, 1993).

$$\% \text{ GD} = ((C_1V_1 - C_2V_2) \times 161 \times 100)/G \quad (3)$$

Onde: GD = grau médio de desacetilação em %, C_1 = concentração do HCl (mol/L), V_1 = Volume de HCl (mL), C_2 = concentração do NaOH (mol/L), V_2 = volume de NaOH (mL), G = peso da amostra de quitosana (mg) e "161" é a massa de uma unidade monomérica da quitosana.

4.2.5 Teor de material insolúvel

O teor de material insolúvel associado a quitosana foi determinado gravimetricamente, usando 10 g de quitosana diluídas em 50 mL de ácido acético 1%. A essa solução foram adicionados 200 mL de água destilada. A solução ficou sob agitação mecânica por 1 hora e, posteriormente, todo conteúdo foi filtrado em funil de placa sinterizada. O funil foi lavado com 200 mL de acetona PA e o conjunto após lavagem foi seco em estufa a 105 °C e finalmente pesado (USP 23, 1995). O teor de matéria de insólúvel (g) foi calculado a partir da diferença entre os pesos inicial e final do funil contendo a quitosana seca antes e após a solubilização/lavagem.

4.3 Produção dos suportes de quitosana

Os suportes de quitosana usados na imobilização do *Aspergillus niger* AN 400 foram produzidos na forma de esferas, membranas e filmes. Estas formas de obtenção da quitosana estão descritas a seguir.

4.3.1 Preparação da solução de quitosana

Inicialmente, 15 g de quitosana foram dissolvidas em 500 mL de ácido acético a 2%. A solução foi mantida sob agitação mecânica (Figura 6) por 12 a 24 horas até a dissolução total do polímero.

Figura 6 - Solução de quitosana sob agitação mecânica.



Fonte: Autor (2015).

4.3.2 Produção de esferas de quitosana

O gel de quitosana a 3% foi gotejado sobre uma solução de hidróxido de sódio 8% (p/v), com o auxílio de sistema de gotejamento (Figura 7), liberando gotas padronizadas de 1 a 2 mm de diâmetro. Após o total gotejamento, as esferas (*beads*) formadas permaneceram na solução alcalina, sob agitação magnética por 40 minutos a fim de aumentar sua consistência e, ao final, foram lavadas com água destilada até pH neutro e, finalmente, secas a 30°C.

Figura 7 - Sistema de gotejamento para produção de esferas de quitosana.



Fonte: Autor (2015).

O sistema experimental de gotejamento para produção das esferas foi construído conforme descrito em Dias *et al.* (2008). Neste sistema a solução de quitosana era conduzida lentamente ao gotejador através de um tubo de látex por uma bomba peristáltica (Master Flex L/S), com controle sensível de fluxo. Ar era fornecido continuamente através de rotâmetro (~ 7 L/min). O gotejador possuía em sua extremidade uma agulha hipodérmica comercial de 0,2 mm. O banho coagulante (NaOH 8%) era constituído por uma cuba de vidro sob agitação magnética constante através de um agitador magnético NT 103.

4.3.3 Imobilização do *Aspergillus niger* AN 400 em esferas de quitosana

Na imobilização, 100 mL do gel de quitosana a 3% foram inoculados com *Aspergillus niger* AN 400 para uma concentração final de 2×10^6 esporos/mL. A suspensão de esporos em quitosana ficou incubada a 28 °C por uma hora sob agitação. Após este período a mesma foi dispensada gota a gota através da agulha hipodérmica para a solução de NaOH 8% visando a formação das esferas ou *beads* de quitosana. Após esse procedimento as esferas permaneceram na solução alcalina e posteriormente foram lavadas com água destilada até pH neutro. Todo o procedimento foi realizado em câmara asséptica de fluxo laminar.

4.3.4 Produção de membranas e filmes de quitosana

Para preparação das membranas de quitosana, o gel de quitosana 3% foi disposto em placas de Petri. O volume da solução foi rigorosamente controlado para obtenção de membranas de espessura padronizada. O gel de quitosana 3% foi seco em estufa a 50 °C por um período aproximado de 1 a 2 dias. Após completamente secas, as membranas foram desprendidas das placas pela adição de uma solução de NaOH 10% para neutralizar o ácido acético. Em seguida, as membranas foram lavadas com água destilada até pH neutro e secas em estufa a 30°C. As membranas secas foram prensadas a fim de evitar enrugamentos.

Para obtenção dos filmes de quitosana, as membranas após neutralização (pH = 7,0) foram imersas em uma solução de glicerol 20% (agente plastificante) por 30 minutos. Após esse tratamento, os filmes foram secos a 30 °C e prensados.

4.3.5 Imobilização do *Aspergillus niger* AN 400 em membranas e filmes de quitosana

Para a obtenção de membranas e filmes com o fungo *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado foram inoculados a 100 mL do gel de quitosana na concentração de 2×10^6 esporos/mL), seguido de incubação a 28 °C por 1 h sob agitação. Em seguida os materiais foram tratados com a solução alcalina, densificados no licor, lavados com água até pH = 7,0 e secos a 30 °C.

4.4 A linhagem *Aspergillus niger* AN400

A linhagem *Aspergillus niger* AN 400 foi desenvolvida no Departamento de Genoma de Fungos da Universidade de Wageningen, na Holanda. Os fungos encontravam-se na forma de esporos ($3,8 \times 10^9$ esporos/mL), contidos em tubo de ensaio (10 mL) e conservados a ± 4 °C, sendo submetidos a descongelamento até alcançar à temperatura ambiente para cultivo (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Os esporos da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 foram cedidos pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE).

4.5 Resistência à ação fungicida da quitosana

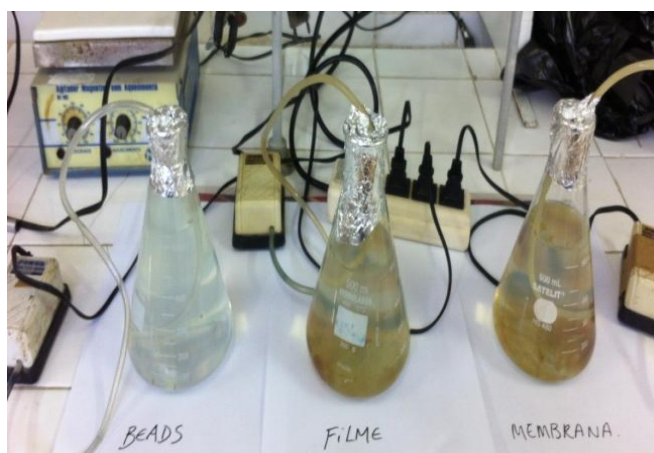
Para avaliar a ação fungicida da quitosana sobre os esporos de *Aspergillus niger* AN 400 foram preparadas: i) 3 placas de Petri contendo 10 mL do meio de cultura Agar solidificado e 200 µL de gel de quitosana a 3% (controle), ii) 3 placas de Petri contendo 10 mL do meio de cultura e 200 µL da suspensão original de esporos (controle negativo) e iii) 3 placas de Petri contendo 10 mL do meio de cultura e 200 µL de uma solução preparada usando 1 mL de gel de quitosana a 3% adicionado de 100 µL da suspensão de esporos (controle positivo) (GOMES, 2007).

Todo material utilizado no experimento, inclusive o meio de cultura ágar batata, foi previamente esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. O plaqueamento foi realizado em capela de fluxo laminar vertical da Pachane[®] com auxílio da chama de um bico de Bunsen, de modo a minimizar a contaminação das placas e para que os meios não solidificassem. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 28 °C, durante 6 dias e observadas a fim de verificar o crescimento da espécie fúngica. Todos os ensaios foram realizados a pH = 6,0; onde a solubilidade da quitosana é mínima e a ação dos grupos amínicos da estrutura é reduzida, o que estabiliza (e minimiza) a atividade antimicrobiana dos mesmos.

4.6 Ensaios de crescimento do *Aspergillus niger* para seleção do suporte de quitosana

Experimentalmente foi realizado ensaio de crescimento do fungo imobilizado nas esferas, filmes e membranas de quitosana a fim de avaliar o desempenho dos mesmos e, a partir daí, selecionar o suporte mais adequado a ser utilizado no ensaio de biodegradação. Para tanto, foram montados três reatores de 500 mL (Figura 8): um Erlenmeyer contendo esferas de quitosana com o fungo imobilizado, outro contendo filmes de quitosana com o fungo imobilizado e outro contendo membranas de quitosana com o fungo imobilizado, os quais operaram durante 10 dias. Os reatores foram alimentados, a cada três dias, com meio nutricional (RODRIGUES, 2006) e aerados através de mini-compressores de ar (50 L/h).

Figura 8 - Ensaios de crescimento do *Aspergillus niger* AN 400 nos diferentes suportes de quitosana preparados.



Fonte: Autor (2015).

4.7 Teste de solubilidade do suporte de quitosana selecionado

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de crescimento o suporte selecionado como de maior eficiência para o desenvolvimento fúngico foi colocado em Becker contendo 20 mL de uma solução tampão de acetato de sódio 0,5 M (pH = 6) e ficou sob agitação durante 24 horas. Após esse tempo, o suporte foi lavado com água destilada até a neutralidade e seco a 105 °C durante 3,5 horas. Ao final, foi colocado para resfriar no dessecador por uma hora e novamente pesado. O ensaio foi realizado em duplicata e as massas do suporte antes e após o tratamento foram comparadas (GARCÍA *et al.*, 2004).

4.8 Microscopia eletrônica de varredura do suporte de quitosana selecionado

A morfologia e microestrutura do suporte selecionado foram identificadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tanto, as amostras foram montadas em *stubs* com o uso de fita adesiva dupla face condutora, recobertas com platina em metalizadora Emitech® e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM 940A sob voltagem de aceleração de 15 kV.

4.9 Biodegradação do pesticida metil paration

4.9.1 Montagem dos reatores em bateladas

Experimentalmente foram montados dois reatores em bateladas: um reator com biomassa fúngica de *Aspergillus niger* AN 400 imobilizada em suporte de quitosana (RBF) e outro reator controle com suporte de quitosana sem o fungo (RC). Os reatores possuíam volume total de 5 L e volume útil de 4,5 L e foram vedados com tampa plástica. A aeração dos reatores foi fornecida por mini-compressores com capacidade de 50 L/h e potência de 5 W. A composição do meio mineral que alimentou o reator em batelada (RBF) para o crescimento da biomassa fúngica está descrita na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição do meio mineral que alimentou os reatores biológicos na etapa de crescimento da biomassa fúngica.

Composição	Concentração (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
NaNO ₃	0,25
KH ₂ PO ₄	0,20
MgSO ₄	0,25
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,08
H ₂ MoO ₄	0,05
MnSO ₄ .5H ₂ O	0,05
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,05
ZnSO ₄	0,04

Fonte: Rodrigues (2006).

O meio nutricional foi autoclavado a 121°C, sob pressão de 1,5 Kgf.cm² durante 20 minutos. Ao reator biológico (RBF) foi adicionado 5 g/L glicose (cossustrato). O crescimento do fungo foi observado durante 15 dias, e a cada três dias o meio mineral foi trocado. Após o processo de crescimento do fungo, o meio aquoso sintético foi preparado com água de torneira, acrescida de 1 mL/L da solução Vishniac (Tabela 8) e o pesticida metil paration a 30 mg/L. Para os estudos de biodegradação foram introduzidos no reator biológico cinco filmes de quitosana com *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado, totalizando 18 g do suporte. No reator controle (RC) a massa total dos filmes de quitosana foi de 17,2 g.

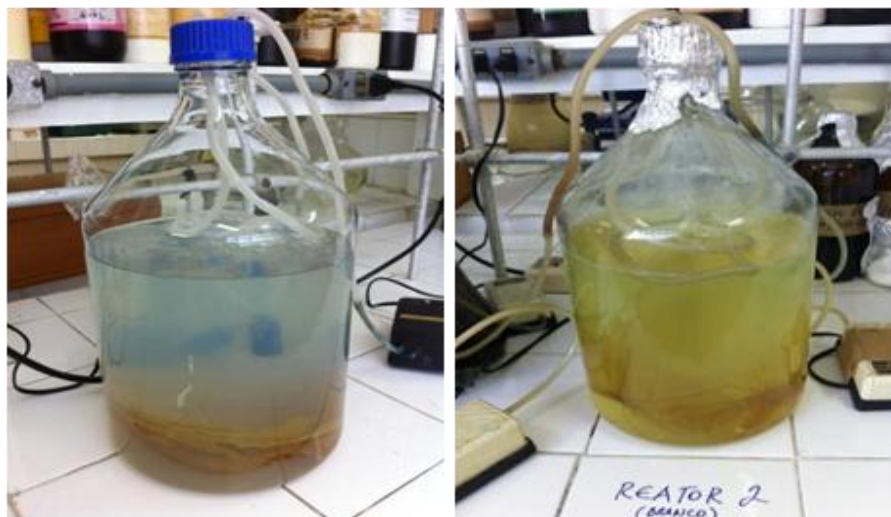
Tabela 8 - Composição química da solução de Vishniac empregada como fonte mineral nos reatores biológicos em batelada.

Composição	Concentração (g/L)
EDTA sal dissódico	10,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,00
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,32
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,22
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,47
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,00

Fonte: Sampaio (2005).

A Figura 9a mostra o reator em batelada contendo a biomassa fúngica imobilizada sobre suporte de quitosana (RBF). O reator controle (Fig 9b) foi montado nas mesmas condições do reator RBF, notadamente com filmes sem a presença do *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado. Os ensaios de biodegradação foram realizados em duplicata e os resultados experimentais correspondem a média aritmética das determinações observadas.

Figura 9 - Imagem do reator em batelada com biomassa fúngica imobilizada sobre suporte de quitosana (a) e do reator controle (b) usados nos estudos de biodegradação do pesticida metil paration.



a) RBF

b) RC

Fonte: Autor (2015).

4.9.2 Operação dos reatores em bateladas

Os reatores foram operados durante 7 dias com retirada de alíquotas ($V = 100 \text{ mL}$) nos tempos reacionais de: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 168 h. Para avaliação da biodegradação foram realizadas análises de: demanda química de oxigênio (DQO), pH e concentração do pesticida.

As análises de demanda química de oxigênio (DQO) foram executadas conforme descrito em APHA (2005). As análises de nitrato e nitrito conforme APHA (2005) foram realizadas apenas no final do processo a fim de avaliar as características finais do efluente após tratamento biológico. As medidas de pH foram realizadas utilizando-se pHmetro *Misura Line* Modelo ML 1010 e as medidas espectrofotométricas quando requeridas foram realizadas em espectrofotômetro Biospectro SP-220.

Para a determinação da concentração de pesticida foi utilizado um cromatógrafo a líquido SHIMADZU Modelo SPD20A/SPD 20AV. Para a análise cromatográfica as amostras foram previamente filtradas em filtros Millipore com $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade antes da injeção. As medidas foram realizadas em quadruplicata para conferir maior precisão aos valores das medidas.

Os parâmetros cromatográficos utilizados na determinação do pesticida encontram-se relacionados na Tabela 9 e a curva de calibração obtida encontra-se no anexo I deste trabalho.

Tabela 9 - Condições analíticas do sistema HPLC usado na determinação do pesticida metil paration.

Parâmetros cromatográficos	Descrição/Valores
Fase móvel	85% de acetonitrila + 15% água
Vazão	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Detector	UV
Absorbância	270 nm
Tempo de corrida	10 min
<i>Parâmetros da coluna analítica</i>	<i>Descrição/Valores</i>
Tipo (coluna de fase reversa)	Column Shim Pack C18 - CLC ODS
Comprimento da coluna /Espessura do filme	25 cm; 4,6 µm

Fonte: Autor (2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização da quitosana como meio de suporte para a imobilização de células fúngicas, na qual essa pesquisa se propõe, é uma tecnologia inédita que gera possibilidades para aplicação na biodegradação de agentes contaminantes. Nesse sentido, os resultados apresentados nesse trabalho oferecem um direcionamento prévio para o desenvolvimento de novas pesquisas com o tema relacionado.

5.1 Caracterização da quitosana comercial

As características físico-químicas tais como: perda por dessecação, determinação do pH, resíduo de ignição, grau de desacetilação e teor de material insolúvel da quitosana comercial estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Características físico-químicas da quitosana comercial usada neste trabalho.

Parâmetro	Valor
Perdas por dessecação	11,5%
pH (1%)	8,1
Cinzas	1,7%
Grau de desacetilação	66,6%
Teor de material insolúvel	14%

Fonte: Autor (2015).

Conforme Santos *et al.* (2011), o grau de desacetilação é uma das características mais importantes da quitosana e pode variar entre 50 e 95%, dependendo da metodologia utilizada. A desacetilação consiste na retirada do grupo acetil da molécula da quitina que será substituído pelo grupo funcional amina, dando origem a molécula da quitosana. O grau de desacetilação calculado foi de 66,6%, o qual se encontra dentro da faixa relatada por estes autores. Em geral, as características físico-químicas apresentaram-se compatíveis com os padrões da quitosana comercial.

5.2 Resistência à ação fungicida do *Aspergillus niger* AN 400 a quitosana

Nesta etapa foram realizados testes comparativos para verificar a resistência da linhagem *Aspergillus niger* AN 400 ao potencial antimicrobiano (fungicida) da quitosana.

Para tanto, utilizou-se três placas contendo meio de cultura e gel de quitosana, três placas contendo meio de cultura, gel de quitosana e esporos de *Aspergillus niger* AN4 00 e três placas contendo meio de cultura e esporos de *Aspergillus niger* AN 400.

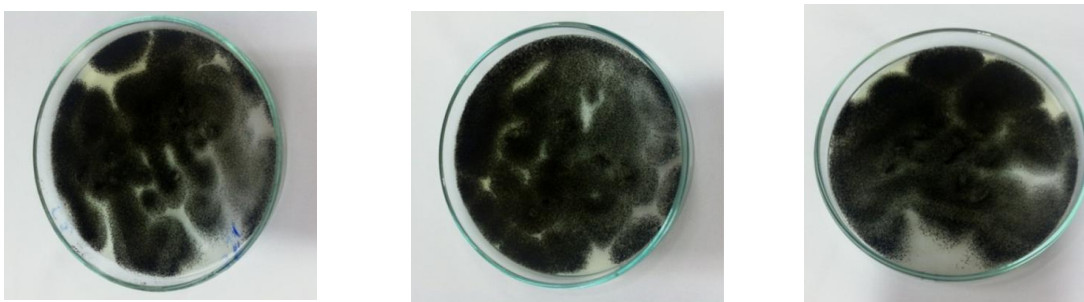
As Figuras 10, 11 e 12 mostram os resultados dos ensaios microbiológicos para avaliação do efeito fungicida da quitosana ao *Aspergillus niger* AN 400.

Figura 10 - Placas utilizadas como "controle" (meio de cultura e gel de quitosana) nos ensaios de avaliação do efeito fungicida da quitosana ao *Aspergillus niger* AN 400.



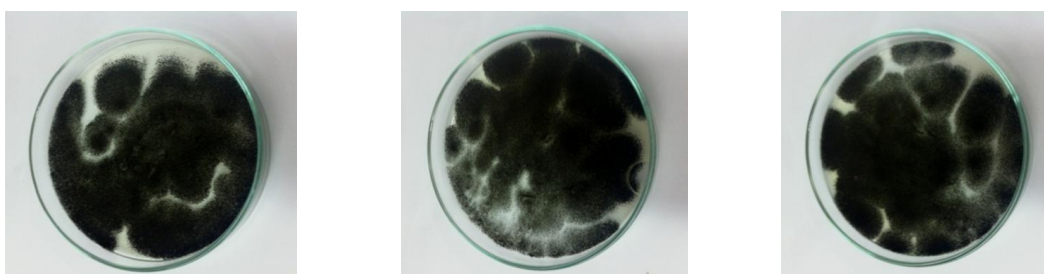
Fonte: Autor (2015).

Figura 11 - Placas utilizadas como indicador negativo da ação fungicida da quitosana ao *Aspergillus niger* AN 400. Composição: meio de cultura e esporos.



Fonte: Autor (2015).

Figura 12 - Placas utilizadas como indicador positivo da ação fungicida da quitosana ao *Aspergillus niger* AN 400. Composição: meio de cultura, gel de quitosana e esporos fúngicos.



Fonte: Autor (2015).

Após 6 dias de incubação do *Aspergillus niger* AN 400 nas placas usadas como indicador positivo e negativo foi observado crescimento (aspecto visual) semelhante do fungo, enquanto nem uma atividade microbiana foi observada nas placas utilizadas como controle. Estes resultados mostraram a partir da metodologia utilizada que a espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 foi resistente ao efeito antimicrobiano da quitosana, o que faz com que essa espécie seja apropriada para a imobilização em suportes desse polímero.

Gomes (2007) avaliou a resistência de esporos e células vegetativas de *Bacillus* sp. LAMI007 à ação antimicrobiana da quitosana, observando que os esporos resistiram a quitosana até 24 h de contato enquanto as células vegetativas foram inibidas logo após 1 h de contato.

Na quitosana, assim como em qualquer suporte polimérico, a imobilização de micro-organismos requer um procedimento rigoroso que avalie os efeitos do polímero nas células aprisionadas, especialmente, no caso da quitosana, pois essa substância possui uma forte atividade antimicrobiana (CHUNG *et al.*, 2004; GIL *et al.*, 2004). Para um micro-organismo ser imobilizado em quitosana é necessário que ele resista à ação tóxica desse polissacarídeo. O segundo critério é que a espécie a ser imobilizada não produza enzimas quitinolíticas, como é o caso da quitosanase, capazes de impedir o desenvolvimento da matriz ou levar a sua desintegração, o que inviabiliza a sua utilização como suporte (GOMES, 2006).

5.3 Produção dos suportes de quitosana e seleção do sistema de imobilização

Os ensaios realizados na produção dos suportes podem ser considerados bastante satisfatórios. As esferas mostraram-se consistentes e uniformes (Figura 13), provavelmente devido ao eficiente controle do sistema de gotejamento.

Figura 13 - Imagem das esferas de quitosana obtidas na pesquisa.



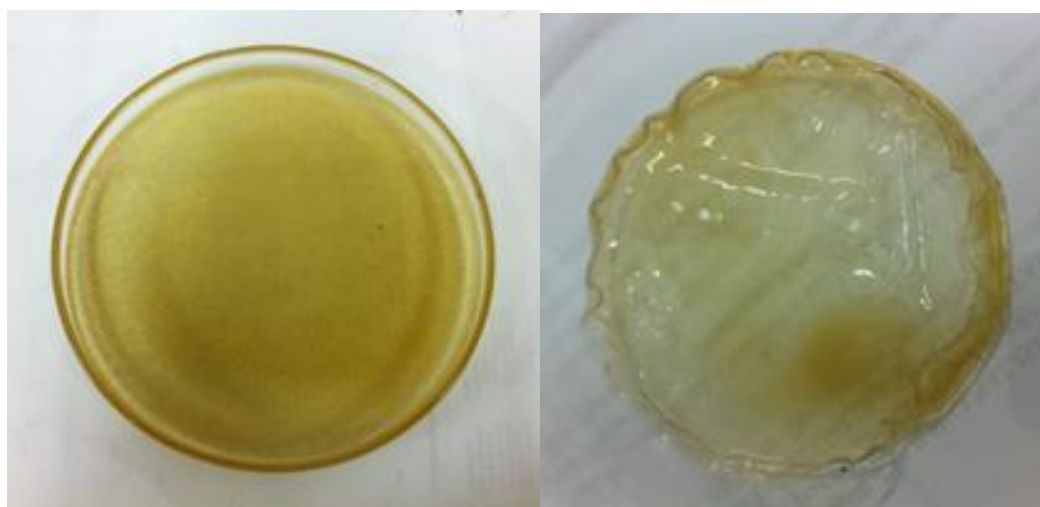
Fonte: Autor (2015).

Segundo Carvalho (2006), a velocidade de agitação, o volume da solução coagulante e a altura apropriada entre o gotejador e o coagulante (NaOH) colaboram para que as gotas de quitosana coagulem isoladamente, evitando assim que as esferas sejam aglomeradas. Para este autor, as soluções de quitosana e do coagulante devem apresentar densidades aproximadamente iguais, assim as gotas de quitosana não encontram resistência satisfatória para se deformarem coagulando rapidamente, mantendo a forma esférica.

Apesar da produção de membranas e filmes de quitosana ser um método simples, a técnica requer alguns cuidados para alcançar um produto de qualidade. Uma das dificuldades para a obtenção da qualidade dos suportes deve-se às impurezas presentes na solução. A retenção de água sobre a placa suporte durante o procedimento de deposição pode conduzir a uma secagem irregular, gerando “bolhas” e, em alguns casos, destacamentos espontâneos em certas localizações podendo levar à ruptura do material (ASSIS; SILVA, 2003).

As membranas de quitosana se apresentaram estáveis e com poucas falhas aparentes. Ao mergulhá-las em glicerol 20%, com a finalidade de dar-lhes plasticidades e evitar o desenvolvimento de enrugamentos e rachaduras foram originados os filmes. Em tempo, é necessário evitar excesso de absorção de glicerol, pois sua alta propriedade plastificante pode propiciar a impermeabilidade do suporte (ASSIS; SILVA, 2003). A Figura 14 mostra as membranas e filmes de quitosana produzidos nessa pesquisa.

Figura 14 - Imagens da membrana (a) e filme de quitosana (b) obtidos na pesquisa.



a)

b)

Fonte: Autor (2015).

O aumento da flexibilidade das membranas poliméricas está diretamente ligado à adição de agentes plastificantes nas suas estruturas, induzindo a uma diminuição das forças intermoleculares ao longo da rede tridimensional. Estes plastificantes possuem a capacidade de reduzir a resistência e aumentam a porcentagem de deformação devido a um aumento na absorção de água pelos filmes, conseguindo uma maior mobilidade na cadeia da quitosana (MARTÍNEZ-CAMACHO *et al.*, 2010; AZEVEDO *et al.*, 2006).

5.4 Seleção do suporte de quitosana para o ensaio de biodegradação

A Figura 15 mostra os perfis de crescimento do *Aspergillus niger* AN 400 nos diferentes suportes de quitosana preparados.

Figura 15 - Ensaios de crescimento do *Aspergillus niger* AN 400 nos suportes de quitosana.



Fonte: Autor (2015).

O acompanhamento reacional durante 10 dias dos três reatores contendo os suportes de quitosana (esferas, filmes e membranas) contendo a espécie fúngica imobilizada mostrou que houve crescimento dos fungos com maior intensidade no reator contendo os filmes de quitosana (Figura 15). Em termos, o filme de quitosana é o suporte que apresenta menor resistência e adsorção na superfície devido à ação do agente plastificante, nesse sentido durante o contato do suporte com o meio aquoso pode ocorrer maior movimentação dos micro-organismos no seu interior, e deste para o meio externo.

Nos reatores contendo esferas e membranas com fungo imobilizado, o crescimento ocorreu de forma lenta, observando-se que é necessário um período maior de tempo para o desenvolvimento fúngico. Dessa forma, o suporte selecionado para o ensaio de biodegradação foi o filme de quitosana, cuja habilidade do crescimento do fungo foi satisfatória em relação ao prazo determinado pelo ensaio.

5.5 Caracterização do filme de quitosana

5.5.1 Teste de solubilidade

Segundo Damian *et al.* (2005), a quitosana é insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, sendo solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6,0, pois é composta de grupos aminos protonáveis e torna-se solúvel em meios polares a baixos pHs.

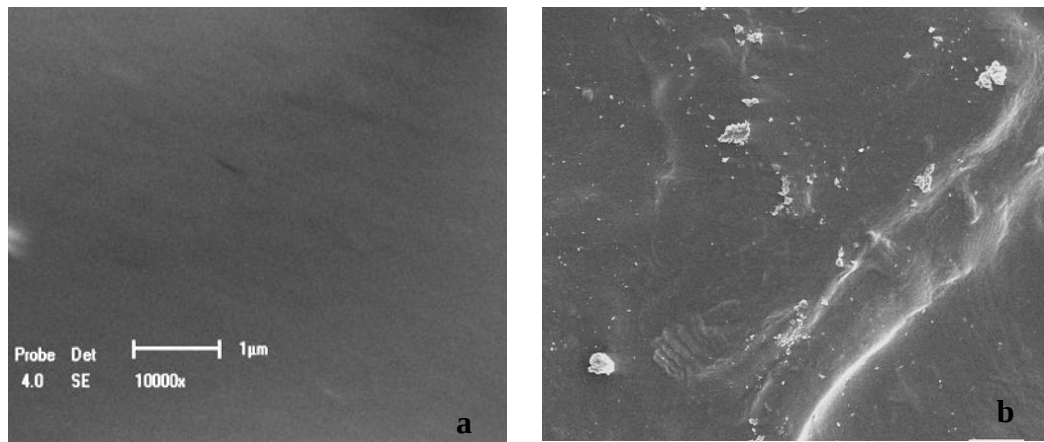
Ao fim do ensaio de avaliação da solubilidade foi observada uma perda de massa de até 7,2%. Destaca-se que o teste de solubilidade aplicado no suporte de quitosana selecionado determinou a resistência do mesmo ao meio ao qual irá atuar. Em geral, o resultado encontrado foi considerado relativamente baixo, justificando a possibilidade de sua aplicação.

Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de dissolução em meio ácido desse polissacarídeo, pode-se utilizar agentes reticulantes (glutaraldeído, formaldeído, ácido sulfúrico, ácidos carboxílicos, genipina, tripolifosfato de sódio, alginato, etc). Estas espécies químicas permitem a formação de ligações cruzadas com a cadeia polimérica principal, favorecendo a obtenção de redes, além de bloquear os grupos amino com um agente bifuncional (COSTA; MANSUR, 2008).

5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que o filme de quitosana usado como suporte revelou uma superfície homogênea de baixo relevo (Figura 16a). Na Figura 16b podem ser observadas células de *Aspergillus niger* AN 400 aderidas à superfície do suporte, o que confirma a imobilização a este suporte.

Figura 16 - Aspecto superficial do filme de quitosana sem células imobilizadas (a) e do filme de quitosana com *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado (b).

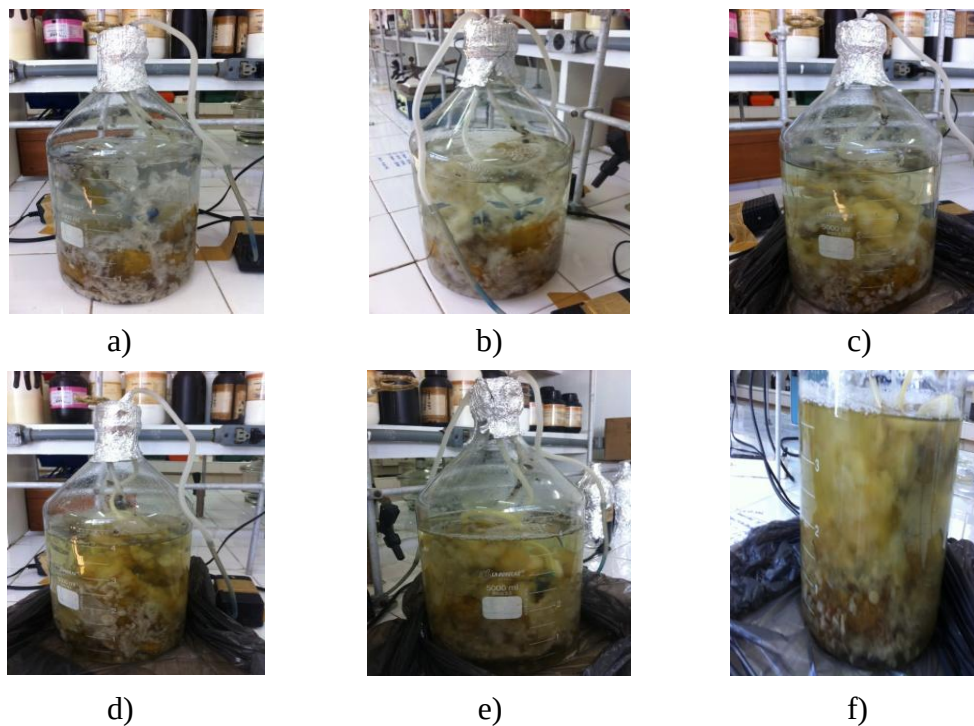


Fonte: Autor (2015).

5.6 Ensaios de remoção do pesticida metil paration com o suporte selecionado

A Figura 17 apresenta imagens ilustrativas do reator biológico em batelada (RBF) em operação a temperatura ambiente.

Figura 17 - Imagens do reator em batelada com biomassa fúngica imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 (RBF) em operação em diferentes tempos reacionais. a) 0 h, b) 24 h, c) 48 h, d) 72 h, e) 96 h, f) 168 h.



Fonte: Autor (2015).

Na Tabela 11 estão mostrados os percentuais de remoção do metil paration nos reatores RBF (reator biológico) e RC (reator controle) ao longo das bateladas de tratamento.

Tabela 11 – Biodegradação de metil paration durante o tratamento biológico com *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado em suporte de quitosana. Massa de filme = $18,1 \pm 0,9$ g.

Reator	% Remoção de metil paration/(concentração residual, mg/L)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	168 h
RBF	0,0%	63,1%	75,9%	79,1%	83,1%	85,4%
	(30,0 mg/L)	(11,1 mg/L)	(7,23 mg/L)	(6,27 mg/L)	(5,07 mg/L)	(4,38 mg/L)
RC	0,0%	7,1%	7,4%	11,5%	15,3%	18,4%
	(30,0 mg/L)	(27,9 mg/L)	(27,8 mg/L)	(26,6 mg/L)	(25,4 mg/L)	(24,5 mg/L)

Fonte: Autor (2015).

Com relação à concentração do pesticida metil paration, observou-se que remoções ocorreram nos dois reatores, RBF e RC, com eficiência total de biodegradação dos sistemas de 85,4% e 18,4% no tempo reacional de 168 h, respectivamente, usando unicamente o pesticida comercial como fonte de alimentação e sem uso de cossubstrato.

A pesquisa realizada por Souza Neto (2012) demonstrou a viabilidade da degradação de águas residuárias sintéticas contendo os pesticidas atrazina, metil paration, paraquat e deltametrina usando reatores em batelada com inóculo de *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado em espuma de poliuretano. Os reatores operaram em 4 ciclos com duração de 7 dias e com a matriz aquosa acrescida de 0,5 g/L de glicose como cossubstrato. As remoções de matéria orgânica foram de 71%, 78%, 72% e 78% para os ciclos operacionais 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Embora de acordo com Singh (2006), a presença de cossubstrato contribua para a melhor utilização do poluente pelos fungos, pois o poluente, ao se envolver em reações secundárias com os produtos formados durante a oxidação enzimática do substrato de fácil assimilação, fica mais disponível à assimilação, os resultados obtidos neste estudo são ainda mais promissores (85,4% de biodegradação), haja vista a ausência de glicose no reator biológico.

Ghosh e Philip (2004), estudando a degradação da atrazina em condições anaeróbias verificaram que a presença de cossubstrato (glicose) resultou em melhor mineralização do herbicida do que no reator que foi empregado de atrazina como única fonte de carbono. O reator que recebeu 150 mg/L de glicose e concentração de atrazina de 15 mg/L

alcançou 43% a 45% de remoção em cinco dias. Entretanto, a remoção de atrazina no reator que utilizou somente o agrotóxico como fonte de carbono foi de 50% e 60%, em 35 e 100 dias, respectivamente, e no reator que usou atrazina como fonte de carbono e nitrogênio, a remoção foi de 30% a 45%, em 150 dias.

No reator controle as remoções podem ser consideradas baixas (< 5 mg/L) e provavelmente estão associadas à adsorção do pesticida ao filme de quitosana ou alguma atividade biológica de outros micro-organismos presentes no ambiente de trabalho.

A Tabela 12 apresenta as remoções da matéria orgânica nos reatores em estudo.

Tabela 12 - Valores de matéria orgânica durante o tratamento biológico com *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado em suporte de quitosana. Massa de filme = $18,1 \pm 0,9$ g.

Reator	% Remoção de DQO/(DQO residual, mg O ₂ /L)					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	168 h
RBF	0,0%	62,1%	96,9%	64,5%	50,7%	32,2%
	(308,5 mg O ₂ /L)	(117,1 mg O ₂ /L)	(9,63 mg O ₂ /L)	(109,4 mg O ₂ /L)	(152,2 mg O ₂ /L)	(209,2 mg O ₂ /L)
RC	(0,0 mg O ₂ /L)	(188,9 mg O ₂ /L)	(201,1 mg O ₂ /L)	(203,1 mg O ₂ /L)	(207,2 mg O ₂ /L)	(229,9 mg O ₂ /L)

Fonte: Autor (2015).

Em termos de DQO, no reator RBF a maior eficiência de remoção foi observada no 2º dia de operação, com percentual de 96,9%. Já no reator controle (RC) observa-se um aumento gradativo da DQO.

Na Tabela 12 observa-se ainda que o reator RBF apresenta significativa remoção de matéria orgânica até 48 horas de operação, período a partir do qual a atividade biológica diminui, o que pode ser atribuído, provavelmente, ao aumento da matéria orgânica no meio reacional devido a dissolução da quitosana em pH ácido (aproximadamente 3,0). A dissolução da quitosana no reator foi verificada a partir dos valores crescentes da DQO no reator controle (RC). Neste contexto deve ser considerado também o aumento da matéria orgânica decorrente da formação de compostos ácidos, os quais são responsáveis pela diminuição do pH do sistema (WANDERLEY, 2007; ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Estudos realizados por Silva *et.al.* (2012) detectaram que o fungo *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado em espuma de poliuretano foi eficiente na remoção de matéria orgânica de efluente sintético de laticínio alcançando uma remoção máxima de 71% da DQO.

As variações de PH nos reatores biológico e controle estão apresentadas na Tabela 13 a seguir.

Tabela 13 – Variações de pH obtidos durante os ensaios de biodegradação nos reatores em batelada contendo biomassa fúngica imobilizada (RBF) e controle (RC).

Reator	Valores de pH					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	168 h
RBF	5,8	2,9	2,7	3,2	3,6	6,5
RC	5,8	6,3	6,4	6,7	7,0	7,3

Fonte: Autor (2015).

Na Tabela 13 observam-se variações acentuadas do pH durante as primeiras 48 h da batelada no reator contendo biomassa fúngica imobilizada em filme de quitosana (RBF), correspondente a variações de até 3,1 unidades de pH, o que pode ser atribuído a degradação do metil paration no meio reacional com a formação de compostos ácidos como o 4-nitrofenol e o dimetil-(1-hidroxibutil) fosfonato e ao consumo preferencial de nitrogênio amoniacal quando NH_4^+ e NO_3^- encontram-se presentes no meio (ESPOSITO, AZEVEDO, 2004). No reator controle (RC), o pH oscilou no intervalo de 5,8 a 7,3, provavelmente devido a dissolução de quitosana no meio, o que tende a elevar o valor do pH.

Estudos realizados por Assis *et al.* (2002) utilizando *Geotrichum candidum* para o tratamento do efluente da indústria do azeite de oliva, observaram diminuição do pH, que também foi atribuída à geração de ácidos orgânicos. Rodrigues *et. al.* (2007), ao empregarem água residuária sintética com fenol em reatores em batelada inoculados com *Aspergillus niger*, observaram redução inicial nos valores de pH, principalmente naqueles que continham glicose como cossubstrato, nos quais a diminuição dos valores de pH foi mais rápida em relação aos demais reatores, representando a atividade microbiana mais intensa.

A faixa ácida de pH é importante para o bom crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* em processos aeróbios, e segundo Wheller (1991) os valores devem se situar entre 3,3 e 7,5 (ótimo em pH = 5,0). Porém, é preciso observar que o meio ácido inviabiliza a integridade do suporte de quitosana, o qual se dissolve em pH inferior a 6,0. Ao final da operação do reator RBF, os filmes de quitosana apresentaram perdas de massa de 25% e 5%, respectivamente no reator biológico contendo quitosana e fungo imobilizado e reator controle.

Quanto aos teores de íons nitrogenados no reator biológico ao fim do processo reacional foram encontrados teores de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) de 4,33 mg/L e 2,29 mg/L, respectivamente, os quais são compatíveis com as concentrações máximas esperadas de NO_3^- (7,06 mg/L) e NO_2^- (5,24 mg/L) a serem obtidas na degradação do pesticida a uma concentração inicial de 30 mg/L.

6 CONCLUSÕES

A quitosana comercial com grau de desacetilação de 66,6% mostrou-se como um adequado biomaterial para a imobilização da *Aspergillus niger* AN 400, principalmente na forma de filmes (suporte selecionado), onde o crescimento microbiano ocorreu com maior intensidade.

Os ensaios microbiológicos de avaliação da ação fungicida da quitosana ao *Aspergillus niger* AN 400 mostraram, nas condições estudadas, uma considerável resistência aos possíveis efeitos tóxicos do suporte de imobilização (filmes de quitosana), justificando a aplicabilidade ou uso dos mesmos.

Os filmes de quitosana preparados apresentaram superfície regular ou homogênea com baixo relevo, maleáveis ou flexíveis quanto a sua trabalhabilidade, o que favoreceu a adesão e a sua manipulação e recuperabilidade dentro do tratamento operacional. A solubilidade em meio levemente ácido (pH = 6,0) mostrou-se baixa (< 8%), o que favorece a aplicabilidade, porém em meio ácido (pH < 4) as perdas de massa foram próximas a 25%.

Os ensaios em reator em batelada contendo o fungo *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado evidenciaram que os filmes de quitosana possuem potencial para uso em biodegradação com pesticidas. Para o metil paration foram encontradas remoções de até 85,4% em 48 horas de tratamento, a temperatura ambiente, pH próximo a 3,0 e na ausência de fonte complementares de glicose.

As variações de DQO nas primeiras 48 horas de tratamento biológico com *Aspergillus niger* AN 400 imobilizado em filmes de quitosana variaram entre 62 e 97%, as quais são promissoras para este tipo de aplicação tecnológica.

Os níveis de NO_3^- (4,33 mg/L) e NO_2^- (2,29 mg/L) são compatíveis com as máximas concentrações teóricas obtidas para a conversão do pesticida e corroboram com as eficiências de biodegradação do tratamento realizado.

Os suportes de quitosana desenvolvidos são “ecologicamente corretos” e inovadores na imobilização de fungos, tem potencial de utilização em tratamentos biológicos de poluentes ambientais de interesse e justificam um contexto de sustentabilidade pelo reaproveitamento de subprodutos da carcinicultura local.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros relatam-se:

- Realizar estudo comparativo das biodegradações de metil paration com células livres e imobilizadas de *Aspergillus niger* AN 400 avaliando os diferentes parâmetros reacionais.
- Investigar a formação de co-produtos na biodegradação do metil paration com *Aspergillus niger* AN 400 visando identificar a rota biológica utilizada e a toxicidade do efluente final produzido.
- Tratar os suportes de quitosana com agentes reticulantes e em diferentes proporções, tendo em vista avaliar a resistência do *Aspergillus niger* AN 400 ao efeito tóxico dessas substâncias.
- Aprimorar o processo de imobilização dos fungos em esferas de quitosana visando operações de tratamento em reatores de leito fixo ou fluidizado, avaliando ainda as propriedades mecânicas dos materiais preparados.
- Avaliar a eficiência de biodegradação em efluentes reais contendo diferentes pesticidas usando reatores biológicos com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400.

REFERÊNCIAS

- ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão, Ano 5, nº4, Dez. 2003.
- ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão, Ano 6, nº1, Mar. 2004.
- ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão, Ano 14, nº1, Jan. 2012.
- ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão, Ano 15, nº1, Jan. 2013.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (BRASIL). **Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA)**. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em 12 jun. 2015.
- APHA/AWWA/WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st Edition, Washington, D. C. American Public Health Association, 2005.
- ASSENHAIMER, C.; RUBIO, J. **Purificação de águas contendo íons sulfato usando resíduos do processamento do camarão**. XIX Prêmio Jovem Cientista – 2003 – Água – Fonte da Vida, p. 42, 2003.
- ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- AZEVEDO, E. P. et al. Mechanical properties and release studies of chitosan films impregnated with silver sulfadiazine. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, p. 3462-3470, 2006.
- BARONI, P.; VIEIRA, R. S.; MENEGHETTI, E.; SILVA, M. G. C. D.; BEPPU, M. M. Evaluation of batch adsorption of chromium ions on natural and crosslinked chitosan membranes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 1155-1163, 2008.
- BEHKI, R. M. et al. Degradation of atrazine, propazine and simazine by *Rhodococcus* strain B-30. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1237- 1241, 1993.
- BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Synthesis and characterization of dense and porous structures of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, n. 4, p. 163-169, 1999.
- BERGER, L. R. R. **Produção e caracterização de quitina e quitosana por *Rhizopus arrhizus* e *Cunninghamella elegans* e aplicação em membranas na remoção de cádmio**. 2013. 180f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells, In: **Methods in Biotechnology**. SHUMAUER, H. P., Totowa: Humana press, v. 1 p. 1-11, 1997.

BNDES – BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **III Simpósio Internacional sobre a Indústria do Camarão Cultivado**. 2006. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/revista/rev2617.pdf>. Acesso em 09 jul. 2015.

BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 2003, 128p.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 314, de 29 de outubro de 2002**. Dispõe sobre o registro de produtos destinados à remediação e dá outras providências. Publicação D.O.U nº 224, de 20 de novembro de 2002, p. 90.

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

BRITTO, D.; CAMPANA-FILHO, S. P.; ASSIS, B. G. Mechanical properties of N,N,N-trimethyl chitosan chloride films. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 142-145, 2005.

CARNEIRO, F. F. et al. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, 2012. 1ª parte. 98p.

CARVALHO, T. V. **Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traço e petróleo**. 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 79-101, 1996.

CAVALCANTI, L. E. Aspectos Geoambientais da Carcinicultura no Rio Grande do Norte e seus desdobramentos legais: a implementação da licença ambiental em defesa do meio ambiente. **REDUNB**, v. 10, p. 71-88, 2012.

CISCATO, C. H. P. **Resíduos de praguicidas em amostras de ovo comercializadas na cidade de São Paulo**. 2008. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CHANDER, M.; ARORA, D. S.; BATH, H. K. Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 94-97, 2004.

CHATTERJEE, S.; ADHYA, M.; GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B. P. Chitosan from *Mucorrouxii*: production and physic-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 395-400, 2005.

CHENG, C. Y.; LI, Y. K. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 32, p. 197-203, 2000.

CHEN, C. C.; CHUNG, Y. C.; WANG, H. L.; CHEN, K. T.; LIN, S. Y. Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 37, p. 1379-1390, 2002.

CHUNG, Y. C.; SU, Y. P.; CHEN, C. C.; JIA, G.; WANG, H. L.; WU, J. C. G.; LIN, J. G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacologia Sinica**, v. 25, p. 932-936, 2004.

CHUNG, Y. C.; LI, Y. H.; CHEN, C. C. Pollutant removal from: Aquaculture Wastewater using the biopolymer chitosan at different molecular weights. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 40, p. 1775-1790, 2005.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n.1, p.99-106, 2005.

CORDAZZO, J. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas**. 2000. 120f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

COSTA, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1460-1466, 2008.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana: a fibra do futuro**. PADETEC, Fortaleza, 2ª ed. Revisada e ampliada, 2004, 215p.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**, 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. **Alimentos e Nutrição**, 2005, 195p.

DAMS, R. I. Pesticida: usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, p. 37-44, 2006.

DIAS, J. C. T.; REZENDE, R. P.; LINARDI, V. R. Biodegradation of acetonitrile by cells of *Candida guilliermondii* UFMG-Y65 immobilized in alginate, k-carragenan and citric pectin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 61-66, 2000.

DORES, E. F. G. C.; FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas, estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27-36, 2001.

DOMARD, A.; RINAUDO, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 5, p. 49-52, 1983.

DOMINGUES, M. R.; BERNARDI, M. R.; ONO, E. Y. S.; ONO, M. A. Agrotóxicos: risco à saúde do trabalhador rural. **Revista de Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, p. 45-54, 2004.

EGGEN, T.; MAJCHERCZYK, A. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by whiterot fungus *Pleurotus ostreatus*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 41, n. 2, p. 111-117, 1998.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. p. 92-122. 2ª ed. Revisada. Caxias do Sul: Educs, 2010.

FEE, D. C.; GARD, D. R.; YANG, C. Phosphorous Compounds. Enciclopédia Kirk – Othmer of Chemistry Technology. John Wiley & Sons: New York, doi: 10.1002/0471238961.16081519060505.a01.pub2, 2005.

FÉLIX, J. P. L. **Remoção de DQO e fenóis totais presentes em efluentes de indústria petrolífera utilizando reatores de leito fixo e fluxo contínuo inoculados com *Aspergillus niger* AN400**. In: KATO, M. T. Gestão e tratamento de resíduos líquidos gerados na cadeia produtiva do petróleo: 1ª coletânea de trabalhos técnicos. Recife: Editora Universitária da UFPE, p. 183-198, 2006.

FERNANDES NETO, M. L.; SARCINELLI, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, p. 69-78, 2009.

FROTA, I. L. N. **Análise dos determinantes da vantagem competitiva da carcinicultura nordestina**, 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Administração) – Programa de Pós-Graduação em Administração, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

FREITAS NETO, M. A. Remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias de refinarias de petróleo através de reatores biológicos com fungos. **Revista Tecnologia**, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2007.

GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Characterization of composite hydrocolloid films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 339-340, 2004.

GAYLARD, C. C.; BELLINASO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biodegradação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 8, n. 34, p. 1-3, 2005.

GEERDINK, M. J.; LOOSDRECHT, M. C. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Biodegradability of diesel oil. **Biodegradation**, v. 7, p. 73-81, 1996.

GIL,G.; DEL MÓNACO, S.; CERRUTTI, P.; GALVAGNO, M. Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacterial and brewing yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 569-574, 2004.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 809-812, 2001.

GINANI, M. F.; NAVARRO, M. V.; NASCIMENTO, E. G.; OLIVEIRA, U. O. B. Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de géis de quitosana. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 801-804, 1999.

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esferas de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos**. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GONZALEZ, M.; MIGLIORANZA, K. S. B.; AIZOUN DE MORENO, J. E.; MORENO, V. J. Evaluation of conventionally and organically produced vegetables for high lipophilic organochlorine pesticide (OCP) residues. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 261-269, 2005.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2ª ed. New York: Wiley-Liss, 458p, 1994.

GUIBAL, E.; VINCENT, T.; SPINELLI, S. Enviromental of chitosan-supported catalysts: Catalytic hollows fibers for the degradation of phenolic derivates. **Separation Science and Technology**, v. 40, p. 633-657, 2005.

GUO, T. Y.; XIA,Y. Q.; WANG, J.; SONG, M. D.; ZHNAG, B. H. Chitosan beads as molecularly imprinted polymer matrix for selective separation of proteins. **Biomaterials**, v. 26, p. 5737-5745, 2005.

HERNÁNDEZ, M. S. et al. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of food Engineering**, v. 73, n. 1, p.93-100, 2006.

HERTEL, R. F. Enviromental Health Criteria 145, Methyl Parathion. World Health Organization – WHO, Geneva, 1993.

JACQUES, R. J. S. et al. Biodegradação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JIANLONG, W.; YI, Q. Microbial degradation of 4-clorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan-chitosan. **Chemosphere**, v. 38, n. 13, p.3109-3117, 1999.

JIANLONG, W.; LIPING,H.; HANCHANG, S.; YI, Q. Biodegradation of quinoline by gel immobilized *Burkholderia* sp. **Chemosphere**, v. 44, p. 1041-1046, 2001.

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 633-658, 2004.

KOUZAYHA, A. et al. Multiresidue Method for Determination of 67 Pesticides in Water Samples Using Solid-Phase Extraction with Centrifugation and Gas Chromatography – Mass Spectrometry. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 257-265, 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial Technology**, v.35, p. 126-139, 2004.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

LARINI, L. **Inseticidas Organossintéticos**. In: Larine, L. Toxicologia dos Praguicidas, 1ª ed. São Paulo, Ed. Manole Ltda, p. 19-91, 1999.

LEMOES, J. L. S.; BARROS, C. A.; OLIVEIRA, S. D.; REICHE, A. P. **Fungos Filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)**. CETEM/MCT, Série Tecnologia Ambiental, p. 58, 2008.

LIM, S. H.; HUDSON, S. M. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemical. **Journal of Macromolecular Science Part C – Polymer Reviews**, v. 43, n. 2, p. 223-269, 2003.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 147-155, 2004.

LOGESH, A. R.; THILLAIMAHARANI, K. A.; SHARMILA. K; KALAISELVAM, M.; RAFFI, S. M. Production of Chitosan from endolichenic fungi isolated from the mangrove environment and its antagonistic activity. **Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 140–143, 2012.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para a ação da vida**. Rio de Janeiro, 2011.

LUZIVOTTO-SANTOS, R. *et al.* Analysis of methyl parathion in tilapia filets using a simple solid phase extraction clean-up and GC-NPD. In: **Braz. J. Food Technol.**, BMCFB, v. 8, 2009.

MAIER, R. M. Microorganisms and Organics Pollutants. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental microbiology**. New York: Academic Press. Chap. 16, p. 363-402, 2000.

MARTÍNEZ-CAMACHO, A. P. et al. Chitosan composite films: thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 305-315, 2010.

MATTHIENSEN, A; MACIEL, E; FURLAN, E; SUCASAS, L E SILVA, L. **Qualidade e Processamento de Pescado**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

MAYNARD, R. L. **The Merck Index**, 12ª ed. London: Chapman and Hill, 1996.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2ª ed. rev. e ampl. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

MENECHINI, Roberta. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica com microextração líquido-líquido para determinação de agroquímicos organofosforados em água**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Regional de Blumenau, Blumenau (SC), 2006.

METCALF & EDDY. **Wastewaters Engineering – Treatment, Disposal, Reuse**. New York: McGraw – Hill, p. 822, 2002.

MILLER, J. D. Mycological investigations of indoor environments. **In: Microorganisms In Home and Indoor Work Environments Diversity, Health Impacts, Investigation and Control**. FLANNIGAN, B.; SAMSON, R. A. & MILLER, J. D. (Eds.), London: Taylor & Francis, p. 231-246, 2001.

MIRANDA, M. P. et al. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 229-235, 1996.

MOORCRAFT, P.; MCLAUGHLIN, P. G. R. **A Militar History**. Yorkshire: Pen & Sword, p. 106, 2008.

MOORE, G. K.; ROBERTS, G. A. F. Determination of degree of N-acetylation of chitosan. **International Journal Biology Macromolecules**, v. 2, p. 115-116, 1980.

MORE, T. T.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. **Potencial use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment**. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7691-7700, 2010.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; FARIA, M. V. C.; ARAÚJO, A. J.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 2, p. 299-311, 2002.

MUZZARELLI, R. A. A., BOUDRANT, J., MEYER, D., MANNOD, N., DeMARCHIS, M., PAOLETTI, M.G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v.87, n. 2, p. 995-1012, 2012.

OLIVEIRA, F. J.; FRANÇA, F. P. Increase in removal of polycyclic aromatic hydrocarbons during bioremediation of crude oil-contaminated sandy soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121/124, p. 593-603, 2005.

PERES, F. **É veneno ou é remédio? Os desafios da comunicação rural sobre agrotóxicos**. 1999. Dissertação (Mestrado), Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1999.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules – American Chemical Society**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RIBEIRO, A. J.; NEUFELD, R. J.; ARNAUD, P.; CHAUMEIL, J. C. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 187, p. 115-123, 1999.

ROCHA, I. P. Carcinicultura Brasileira em 2002. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC**, n.1, p.30-45, 2003.

RODRIGUES, K. A. **Uso de reatores biológicos com fungos para remoção de fenol de água residuária sintética**. 2006. 145f. Tese (Doutorado em Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do Petróleo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cap. 14, p. 307-334. 1998.

SAMPAIO, G. M. M. S. **Remoção de metil paration e atrazina em reatores de bancada com fungos**. 2005. 113f. Tese (Doutorado em Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SANTISTEBAN, A. M. G. **Caracterização do ácido húmico extraído de vermicomposto e estudo de adsorção/dessorção deste e outras matrizes com o herbicida atrazina**. 1999. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

SANTOS, E. M. A. et al. Influência do tempo de detenção hidráulica em um sistema UASB seguido de um reator biológico com fungos para tratar efluentes de indústria de castanha de caju. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 39-45, 2006.

SANTOS, M. C.; CIRILO, A. T.; NUNES, M. L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “Saburica” (*Macrobrachiumjelskii*, Miers, 1877). **Scientia Plena**, v. 7, n. 9, p. 1-3, 2011.

SAYER, J. A.; GADD, G. M. Binding of cobalt and zinc by organics acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. **Mycological Research**, v. 105, p. 1261-1267, 2001.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. Fungos na biodegradação de áreas degradadas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 78, p. 341-350, 2011.

SOUZA NETO, A. **Remoção da matéria orgânica em matriz aquosa dopada com os pesticidas atrazina, metil paration, paraquat e deltrametrina empregados em reatores em batelada inoculados com *Aspergillus niger* NA 400**. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 2012.

SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M. N.; KUMAR, K. R.; THARANATHAN, R. N. Properties of chitosan films prepared under different drying conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 79-85, 2004.

TEIXEIRA, A. S. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. 2007. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

TERBOJEVICH, M.; COSANI, A. Molecular weight determination of chitin and chitosan. **In: Chitin handbook**. MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. (Eds.), Italy: Atec. p. 87-101, 1997.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biodegradação de compostos de petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1010-1020, dez. 2010.

TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.

TSAI, G. J.; HWANG, S. P. In vivo and in vitro antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. **Fisheries Science**, v. 70, p. 675-681, 2004.

TSANG, A.; BUTTLER, G.; POWLOWSKI, J.; PANISKO, E. A.; BAKER, S. E. Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 153-160, 2009.

UNITED STATES PHARMACOPEIA USP 23, p. 1746, 1995.

UNITED STATES PHARMACOPEIA USP 23, p. 1801, 1995.

UNITED STATES PHARMACOPEIA USP 23, p. 1819, 1995.

UNITED STATES PHARMACOPEIA USP 23, p. 1840, 1995.

UNITED STATES PHARMACOPEIA USP 23, p. 1731, 1995.

VASSILEV, N. et al. Olive mill waste water treatment by immobilized cells of *Aspergillus niger* and its enrichment with soluble phosphate. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 617-620, 1997.

ZAMANI, A.; EDEBO, L.; SJÖSTRÖM, B.; TAHERZADEH, M. J. Extraction and Precipitation of Chitosan from Cell Wall of Zygomycetes Fungi by Dilute Sulfuric Acid. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3786–3790, 2007.

WAUCHOPE, R. D. et. al. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 123, p. 1-157, 1992.

WHELLER, K. A. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 2-3, p. 141-149, 1991.

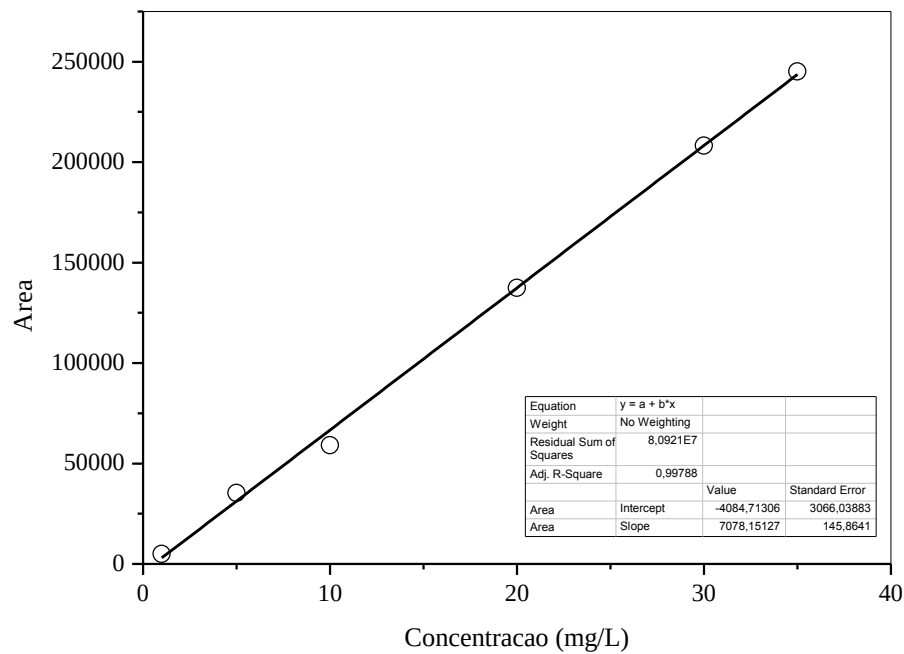
WHO/UNEP. **PublicHealth Impact of Pesticides Used in Agriculture**. Geneva: World Health Organization/United Nations Environment Program, 1990.

YANZE-KONTCHOU, C.; GSCHWIND, N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. **Appl., Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4297-4302, 1994.

YANG, C. F.; LEE, C. M.; WANG, C. C. Isolation and physiological characterization of the pentachlorophenol degrading bacterium *Sphingomonas chlorophenolica*. **Chemosphere**, v. 62, p. 709-714, 2006.

ANEXOS

Anexo I – Curva de calibração para o metil paration.



Fonte: Autor (2015).