

INSTITUTO FEDERAL
CEARÁ
Campus Fortaleza

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

GLEYCIELLE CAVALCANTE PINHEIRO

BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM REATORES
INOCULADOS COM FUNGO E RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO

FORTALEZA – CEARÁ

2016

GLEYCIELLE CAVALCANTE PINHEIRO

**BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM REATORES
INOCULADOS COM FUNGO E RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO**

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Marinho
Silva.

Co-orientadora: Profa. Dra. Kelly Araújo
Rodrigues Pessoa.

FORTALEZA – CEARÁ

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca Waldyr Diogo de Siqueira

P654b Pinheiro, Gleycielle Cavalcante.

Biodegradação de pesticida e produção de enzimas em reatores inoculados com fungo e resíduo lignocelulósico / Gleycielle Cavalcante Pinheiro - Fortaleza: IFCE, 2016.

93p.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental).

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva

1. GESTÃO AMBIENTAL – DISSERTAÇÃO. 2. CASCA DE MANDIOCA. 3. CELULASE. 4. PARAQUAT. 5. BIODEGRADAÇÃO. I. Título.

CDD 628.35

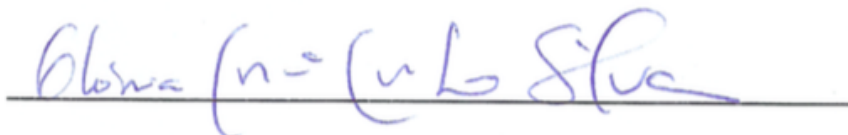
GLEYCIELLE CAVALCANTE PINHEIRO

**BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS EM REATORES
INOCULADOS COM FUNGO E RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO**

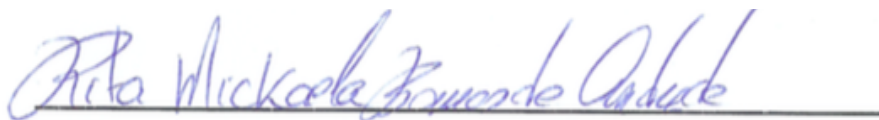
Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e
Gestão Ambiental do Instituto Federal do
Ceará como requisito para obtenção do título
de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em 24/05/2016.

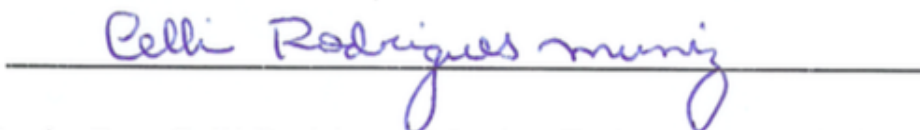
BANCA EXAMINADORA



Presidente Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva – Instituto Federal do Ceará



Membro Profa. Dra. Rita Mickaela Barros de Andrade – Instituto Federal do Ceará



Membro Profa. Dra. Celli Rodrigues Muniz – Embrapa – Agroindústria Tropical

A Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois foi ele quem me guiou e me deu forças para concluir mais uma etapa da minha Vida.

Aos meus pais por todo o incentivo e compreensão.

A minha irmã, “Frenfren”, pela disposição e por sempre querer me ajudar.

Ao meu noivo, Michael, pelas discussões produtivas sobre a pesquisa, pelos “puxões de orelha”, por sempre me incentivar a não desistir por mais árduo que fosse o caminho e por ter sido tão fundamental para a realização desse trabalho.

A minha orientadora e co-orientadora, Profa. Glória Marinho e Profa. Kelly Rodrigues, pelo apoio e orientação em todo o mestrado.

A todos os meus colegas de mestrado, pelo apoio, união e momentos de descontração. Ao David e Joab, pela parceria no laboratório, pelas risadas e desabafos.

Ao Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do IFCE, pela disponibilidade de estrutura física e de material. Aos bolsistas do LATAM, em especial, a Rejane, pela disponibilidade e ajuda na conclusão das análises dessa pesquisa.

Ao Coordenador da Pós-Graduação de Tecnologia e Gestão Ambiental, Prof. Dr. Adeildo Cabral, por me ouvir, pela compreensão e disposição de sempre.

Ao Professor Dr. Rinaldo Araújo, pelas contribuições na qualificação e auxílio no desenvolvimento dessa pesquisa.

A Professora Dra. Ana Karine Pessoa pelas observações realizadas na qualificação.

Ao pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Men de Sá, pelo apoio e incentivo a concluir essa etapa.

Ao Centro de Ensino e Treinamento em Extensão (CETREX), pelo doação das raízes de mandioca utilizadas nessa pesquisa.

A banca de defesa, Profa. Dra. Celli Muniz e Profa. Dra. Rita Mickaela pelas contribuições à pesquisa.

A Funcap, pela concessão da bolsa.

Enfim, obrigada a todos que contribuíram para a realização de mais uma etapa da minha Vida.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho
que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho.”
(Abraham Lincoln).

RESUMO

A grande quantidade de casca gerada no processamento da mandioca pode se tornar um passivo ambiental se não forem encontradas alternativas de uso para esse resíduo. Outro problema ambiental é o uso abundante do herbicida paraquat (PQT) tem causado prejuízos ambientais e ecológicos devido à sua persistência no ambiente. Os objetivos deste trabalho foram avaliar: i) a biodegradação fúngica do PQT; ii) a produção fúngica de celulase a partir da casca de mandioca; iii) e a síntese fúngica de α -amilase a partir de substrato da mandioca. O *Aspergillus niger* AN 400 foi utilizado em todos os testes, com tamanho de inóculo igual a 2×10^6 esporos/mL. Cada experimento teve duração de 168 horas. Na Etapa I, foram estudados reatores aerados em bateladas (2,5 L de volume útil) inoculados com fungo contendo diferentes concentrações de casca de mandioca (0 e 3,0 g/L) e de glicose (0 e 0,5 g/L), mantendo as mesmas concentrações de PQT (30 mg/L) e de solução de Vishniac (1 mL/L). Reatores sem fungo também foram analisados para verificar a adsorção do paraquat na casca de mandioca. Concentração de paraquat, demanda química de oxigênio (DQO) solúvel, pH, sólidos suspensos voláteis e atividade de celulase total foram analisados em diferentes tempos reacionais. Na Etapa II, a atividade dextrinizante da α -amilase foi avaliada em Erlenmeyers (250 mL de volume útil) contendo substrato de mandioca (50 g/L) e meio nutricional. Os resultados da Etapa I mostraram que a taxa de decaimento do PQT se ajustou em um modelo de primeira ordem. As maiores eficiências de remoção de PQT (70,3%) e de DQO (78%) foram registradas no reator com 0,5 g/L de glicose e 1,0 g/L de casca de mandioca (RFPCG 1,0). No entanto, o reator de mesmas condições, porém sem adição de glicose (RFPC 1,0) apresentou eficiências de remoção de PQT e DQO de 69% e 70%, respectivamente, ao final da operação. Isso permite inferir que a glicose não foi determinante para atingir a máxima degradação de PQT. A maior velocidade de decaimento de PQT ($2,19 \text{ h}^{-1}$) foi registrada no reator sem fungo com casca 0,5 g/L (RPC 0,5), enquanto que no reator com fungo, a maior velocidade ($0,21 \text{ h}^{-1}$) foi obtida no reator com 3 g/L de casca (RFPC 3,0). Isso aconteceu, provavelmente, devido ao processo de adsorção inicial seguido de degradação com remoção de paraquat de 60%, após 168 horas. Quanto a produção de celulase total, a máxima registrada foi de 0,36 FPU/mL no reator com fungo, 3,0 g/L de casca e glicose (RFPCG 3,0). Na Etapa II, a produção máxima de α -amilase foi de 0,09 U/mL, porém a presença de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Cu^{2+} liberados durante a composição do substrato inibiram o processo.

Palavras-Chave: Biodegradação. Casca de mandioca. Celulase. Paraquat. α -amilase.

ABSTRACT

The large amount of peel generated in the processing of cassava could become an environmental liability if not found using alternatives to this waste. Another environmental problem is the abundant use of the herbicide paraquat (PQT) has caused environmental and ecological damage due to its persistence in the environment. The aims of this study were to evaluate: i) the fungal biodegradation of PQT; ii) the fungal production of cellulase from cassava peel; iii) the fungal synthesis of α -amylase from cassava substrate. *Aspergillus niger* AN 400 was used in all tests, with inoculum size of 2×10^6 spores/mL. Each experiment lasted 168 hours. In Step I, were used aerated reactors in batch (working volume of 2.5 L) inoculated with the fungus containing different concentrations of cassava peel (0 and 3.0 g/L) and glucose (0 and 0.5 g/L), maintaining the same concentrations of PQT (30 mg/L) and Vishniac solution (1 mL/L). Reactors without fungus were also analyzed in order to check the adsorption of paraquat on cassava peel. PQT concentration, soluble chemical oxygen demand (COD), pH, volatile suspended solids and total cellulase activity were analyzed at different reaction times. In Step II, the α -amylase activity was evaluated in Erlenmeyers (250 mL) containing cassava substrate (50 g/L) and nutrient medium. The results of the Step I showed that PQT decay rate fitted in a first-order model. The highest removal efficiencies of PQT (70.3%) and COD (78.0%) were achieved in the reactor with 0.5 g/L glucose and 1.0 g/L cassava peel (RFPCG 1.0). However, applying the same conditions but without addition of glucose (RFPC 1.0), removal efficiency of PQT and COD were 69% and 70%, respectively, at the end of the operation. Based on these results, is possible to affirm that glucose was not decisive to achieve maximum degradation of PQT. The greater decay speed of PQT (2.19 h^{-1}) was registered in the reactor without fungus with 0.5 g/L (RPC 0.5), while in the reactor with fungus, the highest rate (0.21 h^{-1}) was obtained in the reactor containing 3.0 g/L peel (RFPC 3.0). This occurred probably due to initial adsorption process followed by degradation with paraquat removal of 60% after 168 hours. The highest production of total cellulase (0.36 FPU/mL) occurred in the reactor with fungus, glucose and 3.0 g/L peel (RFPCG 3,0). In the Step II, the highest production of α -amylase was 0.09 U/mL, but the presence of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} released during the substrate composition inhibited the process.

Key-words: Biodegradation. Cassava peel. Cellulase. Paraquat. α -amylase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fórmula estrutural do herbicida paraquat.	20
Figura 2	Processos que ocorrem no ambiente quando há lançamento de agrotóxicos.	22
Figura 3	Fluxograma do beneficiamento de raízes de mandioca para a produção de farinha e fécula	27
Figura 4	Representação da molécula de celulose.	28
Figura 5	Representação da composição de materiais lignocelulósicos.	29
Figura 6	Representação da hidrólise da celulose pela ação de enzimas celulolíticas.	31
Figura 7	Raízes de mandioca.	35
Figura 8	Parte aérea com folhas e hastes da mandioca utilizada nessa pesquisa.	36
Figura 9	Estrutura das cadeias moleculares da amilose (a) e amilopectina (b).	37
Figura 10	Classificação das enzimas amilolíticas responsáveis pela degradação do amido.	38
Figura 11	Representação de hidrólise do amido pela ação de enzimas amilolíticas.	39
Figura 12	Estrutura da α -amilase.	40
Figura 13	Ataque das α -amilases sobre a amilose e amilopectina da molécula de amido.	40
Figura 14	Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos.	43
Figura 15	Fluxograma da preparação da casca de mandioca para utilização nos ensaios de biodegradação de paraquat e produção da enzima celulase.	47
Figura 16	Reatores de vidro com volume útil de 2,5 L utilizados nos ensaios.	49
Figura 17	Fluxograma da preparação do substrato de mandioca utilizado nos ensaios de fermentação submersa para produção de α -amilase por <i>Aspergillus niger</i> AN 400.	51
Figura 18	FSm em frasco Erlenmeyer de 250 mL após autoclavagem do substrato de mandioca e do meio.	52
Figura 19	Incubadora de bancada utilizada nos ensaios de fermentação submersa.	53
Figura 20	Cinética de decaimento do paraquat ajustada em um modelo de primeira ordem nos reatores com fungo (a) e sem fungo (b).	57
Figura 21	Eficiências de remoção de paraquat nos reatores com fungo e sem fungo com concentrações de 0, 0,5, 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca e 30 mg/L de paraquat em 168 horas de operação.	58
Figura 22	Crescimento de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 sobre a casca de mandioca nos reatores com fungo no decorrer de 168 horas de experimento.	61
Figura 23	Constantes de velocidade de decaimento do PQT nas concentrações de 0,5, 1,0, 3,0 g/L de casca de mandioca, seguindo um modelo de primeira ordem.	62

Figura 24 Cinética da variação de DQO solúvel nos reatores com fungo (a) e sem fungo (b) com concentrações de 0,5, 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca e 30 mg/L de paraquat em 168 horas de operação.	64
Figura 25 Eficiências da remoção de DQO solúvel nos reatores com fungo (a) e sem fungo (b) com concentrações de 0,5; 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca e 30 mg/L de paraquat em 168 horas de operação.	65
Figura 26 Crescimento de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 nos reatores, após 168 horas, com concentração de 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca adicionados de 0,5 g/L de glicose, inoculados com 2×10^6 esporos/mL, 30 mg/L de paraquat e 1 mL/L de Vishniac.....	67
Figura 27 Variação de pH nos reatores sem fungo.....	68
Figura 28 Variação de pH nos reatores com fungo.	68
Figura 29 Valores de atividade de celulase total nas bateladas com fungo, paraquat e casca de mandioca nas concentrações 0,5, 1,0 e 3,0 g/L, no período de 168 horas.....	71
Figura 30 Variações do pH e produção de α -amilase na batelada de fermentação submersa com <i>Aspergillus niger</i> AN 400, no período de 168 horas, com as seguintes condições experimentais: 30°C, 150 rpm, 50 g/L de substrato de mandioca e tamanho de inóculo de 2×10^6 esporos/mL.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais propriedades físico-químicas do herbicida PQT.....	23
Tabela 2	Aplicações de enzimas em diversos setores industriais.....	30
Tabela 3	Produção de celulases por fungos a partir de resíduos agroindustriais.	33
Tabela 4	Usos e utilidades da mandioca.....	35
Tabela 5	Substratos utilizados para a obtenção de enzimas α -amilases fúngica e bacteriana através de fermentação em estado sólido e submersa.....	41
Tabela 6	Características dos ensaios realizados nessa etapa.	49
Tabela 7	Configuração das bateladas aeradas com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 variando a concentração da casca de mandioca e presença de glicose.....	49
Tabela 8	Composição do meio nutricional.	52
Tabela 9	Variações de concentrações de sólidos suspensos voláteis (SSV) nas bateladas de diferentes concentrações de casca de mandioca inoculadas com <i>Aspergillus niger</i> AN 400...	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA	American Public Health Association
CETREX	Centro de Ensino e Treinamento em Extensão
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FES	Fermentação em estado sólido
FSm	Fermentação submersa
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFCE	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará
LATAM	Laboratório de Tecnologia Ambiental
LTB	Laboratório de Tecnologia da Biomassa
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (Ágar Batata Dextrose)
pH	Potencial Hidrogeniônico
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PV	Pressão de vapor
RP	Reator sem fungo, com paraquat
RPC	Reator sem fungo, com paraquat e casca de mandioca
RPCG	Reator sem fungo, com paraquat, casca de mandioca e glicose
RFP	Reator com fungo e paraquat
RFPC	Reator com fungo, paraquat e casca de mandioca
RFPCG	Reator com fungo, paraquat, casca de mandioca e glicose
S	Solubilidade em água

SSV Sólidos Suspensos Voláteis

TR Tempo Reacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Geral.....	19
2.2	Específicos	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1	Paraquat e fungos	20
3.1.1	<i>Paraquat.....</i>	20
3.1.2	<i>Características dos fungos</i>	24
3.1.3	<i>Importância dos fungos no processo de degradação de pesticidas</i>	25
3.2	Produção fúngica de celulase a partir de casca de mandioca.....	26
3.2.1	<i>Casca de mandioca</i>	26
3.2.2	<i>Celulose.....</i>	28
3.2.3	<i>Enzimas celulolíticas.....</i>	29
3.2.4	<i>Fungos filamentosos na produção de celulase</i>	32
3.3	Produção de α-amilase a partir de substrato de mandioca	34
3.3.1	<i>Mandioca.....</i>	34
3.3.2	<i>Amido</i>	37
3.3.3	<i>Enzimas amilolíticas</i>	38
3.3.4	<i>Fungos na produção de α-amilase por fermentação submersa</i>	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1	Etapa I: Biodegradação fúngica do paraquat e produção de celulase a partir da casca de mandioca	46
4.1.1	<i>Preparação da casca de mandioca</i>	46
4.1.2	<i>Cultivo do fungo <i>Aspergillus niger</i> AN 400 e preparação da suspensão de esporos</i>	47
4.1.3	<i>Montagem, operação e monitoramento dos reatores para os ensaios de biodegradação de paraquat e produção de celulase em bateladas aeradas com biomassa dispersa</i>	48
4.2	Etapa II: Produção de α-amilase a partir de substrato de mandioca.....	50
4.2.1	<i>Preparação do substrato de mandioca</i>	50
4.2.2	<i>Montagem dos ensaios de fermentação submersa para a produção de α-amilase</i>	52
4.3	Métodos analíticos	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

5.1 Etapa I: Biodegradação fúngica de paraquat e produção de celulase a partir da casca de mandioca	56
5.2 Etapa II: Produção de α-amilase a partir de substrato de mandioca.....	72
6 CONCLUSÕES	76
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

A contaminação por agrotóxicos em ambientes aquáticos vem aumentando gradativamente prejudicando os seres vivos que ali circundam. Devido à toxicidade e persistência desses poluentes no ambiente, a grande maioria possui alto potencial de bioacumulação na flora e na fauna aquática, o que possibilita a entrada desses contaminantes na cadeia alimentar provocando prejuízos ao corpo d'água e à saúde pública (CHABUKDHARA; NEMA, 2012).

O herbicida paraquat (PQT) é comumente empregado no controle de ervas daninhas, porém, quando em contato com o solo é rapidamente absorvido e se liga fortemente à terra e à matéria orgânica se tornando biologicamente inerte, não podendo ser absorvido pelas raízes de plantas ou por outros organismos. O solo é capaz de absorver grandes quantidades de contaminantes sem sofrer muitas transformações. Entretanto, com o passar do tempo, essas transformações quase sempre são irreversíveis e os danos causados ao meio ambiente são de difícil recuperação (CAMARGO, 2007; BRITTO, 2012).

Outro problema ambiental bastante relevante é a grande quantidade de resíduos, tanto sólidos como líquidos, que são produzidos diariamente por diversos setores agroindustriais. Em sua maioria, os resíduos agroindustriais possuem elevado potencial poluente e têm sua disposição final inadequada, levando à perda de biomassa e de nutrientes de alto valor (LAUFENBERG et al., 2003), tornando-se um passivo ambiental. Durante o processamento industrial da mandioca são gerados resíduos sólidos (casca, entrecasca e bagaço) e líquidos, uma vez que o processo de extração da fécula de mandioca ainda carece de avanços tecnológicos (CAMARGO; LEONEL; MISCHAN, 2008).

Nas fecularias, a casca da mandioca é produzida em grandes quantidades, cerca de 50 kg são resultantes do processamento de cada tonelada de mandioca (LEONEL; CEREDA, 2000). Logo, se a produção brasileira de mandioca na safra de 2015 foi de 24 milhões de toneladas (IBGE; SEAB/DERAL, 2015), então a produção de casca foi de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas.

Uma alternativa para a biorremediação de águas contaminadas com PQT é o processo de degradação fúngica em reatores de bateladas aeradas inoculados com *Aspergillus niger*, fungo filamentoso com alto potencial degradativo, capacidade de sobrevivência em condições de estresse ambiental e de baixo pH, e secretor de proteínas (CHANDER; ARORA; BATH, 2004; CONCEIÇÃO, 2005; HARBHAJAN, 2006). Porém, quando adicionado a

esse processo a casca de mandioca como resíduo lignocelulósico, esse fungo ainda é capaz de produzir enzimas, como celulase e amilase (FRANCIS et al., 2003; SPIER, 2005; GANGADHARAN et al., 2006; MEKALA et al., 2008; KAR; DATTA; RAY, 2010; STROPARO et al., 2012) devido à sua alta capacidade de degradar diferentes substratos e por apresentar diversificado aparato enzimático (CHANDER; ARORA; BATH, 2004; CONCEIÇÃO, 2005; HARBHAJAN, 2006), promovendo assim a redução da carga poluidora do PQT como também da casca de mandioca.

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de degradação do PQT, a produção de celulase do fungo *Aspergillus niger* AN 400 a partir da casca de mandioca por meio de bateladas aeradas com biomassa dispersa e produzir α -amilase a partir de substrato de mandioca via fermentação submersa.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a degradação do herbicida PQTe produzindo celulase em reatores em bateladas aeradas inoculados com *Aspergillus niger* AN 400 e casca de mandioca, bem como produzir α -amilase pelo mesmo fungo a partir de substrato de mandioca.

2.2 Específicos

- Verificar a influência da concentração de glicose e da casca de mandioca na biodegradação do PQT;
- Estimar parâmetros cinéticos aparentes de decaimento da concentração de PQT;
- Quantificar a massa de PQT adsorvida na casca de mandioca em diferentes concentrações;
- Quantificar a atividade de celulase total por *Aspergillus niger* AN 400 utilizando casca de mandioca em diferentes concentrações nos reatores durante a degradação do herbicida;
- Verificar a influência da concentração de glicose e da casca de mandioca na produção de celulase pelo fungo;
- Avaliar a produção de α -amilase por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de substrato de mandioca via fermentação submersa.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

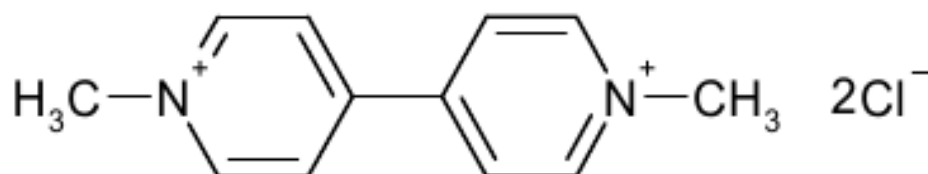
Nesse tópico estão apresentados os fundamentos da pesquisa sobre paraquat, a atuação e importância dos fungos na degradação desse herbicida; mandioca e seus resíduos, e a produção de enzimas por fungos a partir de compostos celulósicos e amiláceos.

3.1 Paraquat e fungos

3.1.1 Paraquat

O paraquatou dicloreto de 1,1-dimetil-4,4-bipiridina ($C_{12}H_{14}N_2Cl_2$) (Figura 1), comercializado principalmente como Gramoxone 200®, é um herbicida pertencente ao grupo químico dos bipiridílios. Na forma de sal de cloreto, é um composto quaternário do amônio, não seletivo (destrói a vegetação sobre a qual é aplicado), de ação rápida, de baixo custo, possui alta solubilidade na água, alta persistência no ambiente e age contra a predação de plantas daninhas (SERRA et al., 2003).

Figura 1 - Fórmula estrutural do herbicida paraquat.



Fonte: FAO (2003).

Este herbicida é empregado no controle de ervas daninhas em diversas culturas agrícolas como arroz, fumo, café, uva, algodão, feijão, abacaxi, maçã, (BRITTO, 2012; ANVISA, 2014), porém, quando em contato com o solo é rapidamente absorvido e se liga fortemente à terra e à matéria orgânica se tornando biologicamente inerte, não podendo ser absorvido pelas raízes de plantas ou por outros organismos. O solo é capaz de absorver grandes quantidades de contaminantes sem sofrer grandes transformações. Entretanto, com o passar do tempo, estas transformações quase sempre são irreversíveis e os danos causados ao meio ambiente são de difícil recuperação (CAMARGO, 2007).

A persistência desse herbicida no ambiente caracteriza-se pela forte adsorção do seu cátion, o dicátion paraquat (PQ^{2+}), nas argilominerais do solo, o que causa a desativação do composto diminuindo sua disponibilidade à biodegradação e à fotólise (BROMILOW, 2004; TYSZCZUK-ROTKO; BECZKOWSKA; NOSAL-WIERCIŃSKA, 2014).

As plantas também são impactadas pela uso desse agrotóxico. De acordo com

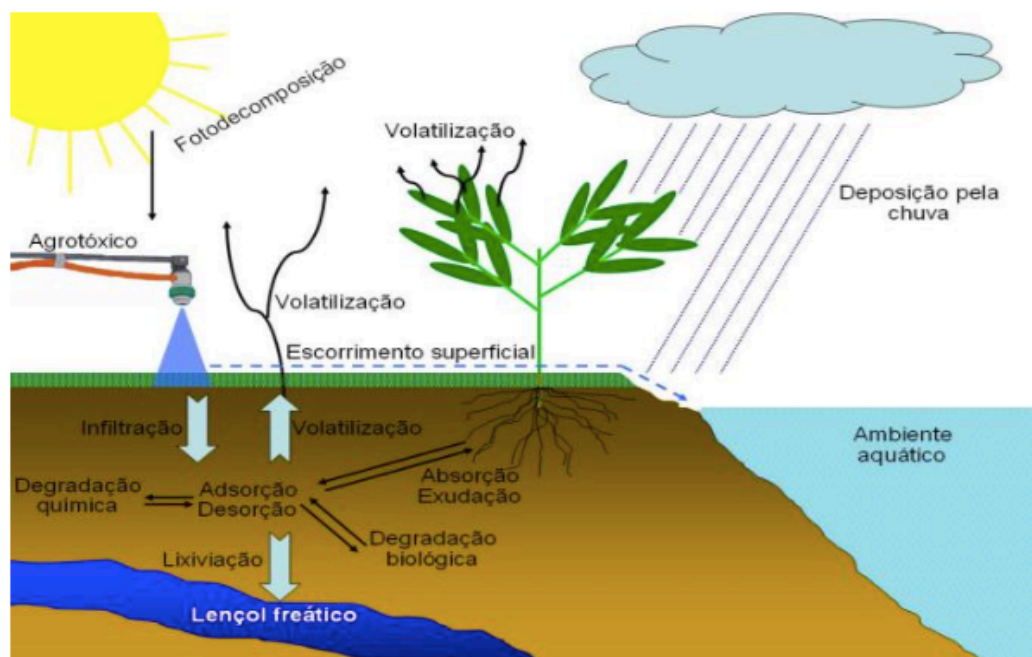
Serra et al. (2003), na presença de luz, o PQT age desidratando as partes verdes das plantas com as quais entra em contato. O local de ação do PQT é o cloroplasto contendo os sistemas fotossintéticos das plantas que absorvem a energia luminosa usada para produzir energia. Os elétrons livres formados reagem com o íon do PQT resultando na forma de radical livre. O oxigênio rapidamente converte esse radical produzindo ânions superóxidos (O_2^-), altamente reativos, que atacam os ácidos graxos insaturados das membranas abrindo e desidratando, rapidamente, membranas e tecidos das células. O maior dano causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica da membrana celular resultando em um desequilíbrio no metabolismo aeróbio e uma grave ameaça à homeostase celular.

Catunda et al. (2005), estudaram o efeito do PQT nas folhas das plantas, em determinadas concentrações, e observaram que o uso do herbicida proporcionou médias de clorofila e carotenóides menores que aquelas das plantas controle, sendo visíveis os sintomas de clorose intensa e necrose dos tecidos ainda nos primeiros dias após a aplicação.

No homem, acontece de forma semelhante às plantas. O herbicida é reduzido pela enzima NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo)-citocromo P450 redutase com a transferência de um elétron, formando o radical paraquat. Este, na presença de oxigênio, oxida-se rapidamente produzindo um ânion radical superóxido e regenera o PQT. Dessa forma, repetidos ciclos de redução e re-oxidação do herbicida podem ocorrer formando uma grande quantidade de espécies de oxigênio reduzido que levam o organismo ao estresse oxidativo ou à peroxidação de gorduras (TAMPO et al., 1999).

O PQT também pode atingir ecossistemas aquáticos, nos quais o aporte pode ocorrer por escoamento superficial, lixiviação do solo, derramamento acidental ou pelo descarte incorreto de embalagens e pelo lançamento de efluentes industriais que o produzem (SANTOS; ALVES; MADEIRA, 2011; BRITTO et al., 2012; GARCIA et al., 2013). Na Figura 2 estão apresentados os possíveis processos que podem ocorrer no meio ambiente quando há a aplicação de agrotóxicos no solo.

Figura 2 - Processos que ocorrem no ambiente quando há lançamento de agrotóxicos.



Fonte: Lavorenti et al. (2003).

Inicialmente no solo, as moléculas do agrotóxico podem ser retidas pelos colóides minerais e orgânicos e a partir daí, passar para formas indisponíveis ou ser novamente liberada para a solução do solo através de um processo denominado desorção. As moléculas também podem ser transformadas em outras, chamadas de metabólitos. Para muitas moléculas de agrotóxicos, o ponto final dessa transformação é a degradação biológica a gás carbônico, água e íons minerais. Quando a molécula se encontra na solução do solo, pode ser absorvida pelo sistema radicular das plantas, lixiviada para camadas mais profundas do solo, podendo atingir águas subterrâneas ou ainda ser volatilizada. O escoamento superficial também pode acontecer devido o arraste dessas moléculas para o corpo d'água através das chuvas. Todos esses processos ocorrem simultaneamente no solo em intensidades diferentes (LAVORENTI et al., 2003).

Uma vez que o PQT é lançado em ambientes aquáticos, o herbicida torna-se passível de atingir a população através da água de abastecimento público devido aos tratamentos convencionais de água e efluentes não serem eficientes na remoção de substâncias persistentes (DE LEÓN et al., 2008; ZHANG et al., 2010). O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) ainda não elaborou uma resolução que estabeleça limites máximos aceitáveis de PQT na água (CONAMA, 2005), entretanto, pode ser tomado como referência o limite estabelecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

(EPA), de 0,1 mg/L (EPA, 2012).

Segundo Lavorenti et al. (2003), as principais propriedades físico-químicas das moléculas de agrotóxicos relacionadas ao seu comportamento no ambiente são: solubilidade em água, coeficiente de partição n-octanol-água, pressão de vapor, constante de ionização do ácido, constante da lei de Henry e coeficiente de adsorção à matéria orgânica. A Tabela 1 apresenta as principais propriedades físico-químicas do PQT.

Tabela 1 - Principais propriedades físico-químicas do herbicida PQT.

Propriedades físico-químicas	Valor
Solubilidade em água à 20°C (S)	620.000 mg/L
Coeficiente de partição n-octanol-água (log K _{OW})	-4,50
Pressão de vapor (PV)	10 ⁻² mm Hg
Constante de ionização (pK _a)	NA
Constante da lei de Henry (K _H)	4 x 10 ⁻¹² Pa.m ³ .mol ⁻¹
Coeficiente de adsorção à matéria orgânica (K _{OC})	1.000.000 mL/g

Nota: NA – não aplicável (espécie não sofre ionização).

Fonte: Milhome et al. (2009).

Conforme apresentado na Tabela 1, o PQT possui alta solubilidade em água, o que indica sua maior probabilidade de ser carregado pelas águas de chuvas ou de irrigação e atingirem corpos d'água (MILHOME et al., 2009).

O coeficiente de partição n-octanol-água indica o caráter lipofílico da molécula, isto é, a afinidade por fases orgânicas, como também prevê a acumulação de pesticidas em ambientes aquáticos e terrestres. Quando esse coeficiente é maior que 3, o pesticida tende a bioacumulação no ambiente (BARCELÓ; HENNION, 1997). Como o valor desse coeficiente do PQT é muito baixo, logo ele apresenta pouca tendência bioacumulativa.

A constante da lei de Henry indica a distribuição da espécie entre a fase líquida e a fase gasosa dependendo da temperatura, já a pressão de vapor define a taxa de concentração de equilíbrio entre a água e o ar, e ambos estão relacionados à volatilidade do composto. Então, compostos com K_H menores que 10⁻⁵ Pa.m³.mol⁻¹ apresentam baixa volatilidade, como é o caso do PQT, indicando que o herbicida pode permanecer por mais tempo no ambiente aquático (MILHOME et al., 2009).

O PQT apresenta o valor de 1.000.000 mL/g para o coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo, o que indica seu potencial de mobilidade no solo. Pesticidas com K_{OC} abaixo de 50 são considerados de alta mobilidade; valores entre 150-500 são moderadamente móveis e, acima de 2.000, possuem baixa mobilidade no solo (BARCELÓ;

HENNION, 1997), logo, esse herbicida é facilmente retido no solo e dificilmente transportado pela água.

Uma alternativa à biorremediação de águas contaminadas com PQT é o processo de biodegradação por fungos filamentosos (DA SILVA, 2015), uma vez que é um processo bastante viável e representa a busca por avanços tecnológicos sustentáveis e eficientes no tratamento de águas contaminadas por compostos persistentes (ESPLUGAS et al., 2002).

3.1.2 Características dos fungos

Os fungos se destacam pela sua natural adaptação de crescerem aderidos ou imobilizados em superfícies sólidas favorecendo a absorção de nutrientes, a secreção de enzimas e o crescimento apical das hifas (HARDING et al., 2009).

Alto potencial degradativo, capacidade de sobrevivência em condições de estresse ambiental e de baixo pH, secretor de proteínas, grande potencial bioassortivo e diversificado aparato enzimático são características que tornam os fungos fundamentais na biorremediação de compostos persistentes, como os pesticidas (CHANDER; AROR; BATH, 2004; CONCEIÇÃO, 2005; HARBHAJAN, 2006).

De acordo com Lemos et al. (2008), a biodegradação fúngica de compostos persistentes consiste na biotransformação do poluente, o qual será utilizado pelo micro-organismo como fonte de carbono e energia, resultando na mineralização do poluente ou em subprodutos menos tóxicos. O mesmo autor afirma que o crescimento micelial permite que o fungo se desenvolva rapidamente sobre o substrato, digerindo-o através da excreção de enzimas extracelulares.

Com mais de 200 espécies, o gênero *Aspergillus* é o grupo mais utilizado na produção de enzimas pelas indústrias e é bastante aplicado na biotecnologia (WAINWRIGHT, 1995; DA SILVA, 2015). As espécies mais utilizadas são *Aspergillusniger*, *Aspergillusoryzae*, *Aspergillusversicolor*, *Aspergillusflavus*, *Aspergillustamarii*, *Aspergillusawamori* (MOREIRA et al., 1999; GUPTA et al., 2003; SANDHYA et al., 2005; HERNANDEZ et al., 2006; ALMEIDA et al., 2009).

O *Aspergillus niger* é um fungo filamentoso negro, denominado de “mofo negro”, pertencente ao reino Fungi, filo *Ascomycota*, ordem dos *Eurotiales*, família *Trichocomaceae* e gênero *Aspergillus*, porém alguns fungos desse gênero são considerados deuteromicetos (WAINWRIGHT, 1995).

Essa espécie fúngica é capaz de produzir 19 tipos de enzimas, dentre elas, as celulasas, α -amilases, amiloglicosidases, poligalacturonases, glicose oxidase, hemicelulasas, xilanases (FREDERICK, 1990; PANDEY et al., 1999; PARK et al., 2002; KANG et al., 2004; HERNANDEZ et al., 2006; MENEZES, 2006; CUNHA, 2011).

3.1.3 Importância dos fungos no processo de degradação de pesticidas

Em pesquisas realizadas na década de 80, os fungos filamentosos já eram amplamente utilizados em estudos de biorremediação de poluentes orgânicos persistentes (POPs), tais como pesticidas clorados, dioxinas (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina), bifenilas policloradas, além de hidrocarbonetos aromáticos, pentaclorofenol e hexaclorobenzeno. Tais linhagens de fungos envolvidas na degradação dessas moléculas incluem: *Phanerochaete* sp, *Aspergillus* sp., *Lentinus crinitus*, *Peniophoracinerea* sp., *Phellinus gilvus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa* (MATHEUS et al., 2000; MACHADO et al., 2005; VITALI et al., 2006; BALLAMINUT; MATHEUS, 2007).

Sayer et al. (2001) observaram que os fungos filamentosos são produtores de uma gama de compostos, como ácidos orgânicos simples, álcoois, polissacarídeos, ácidos húmicos, fúlvicos e proteínas. Além disso, esses micro-organismos podem absorver metais presentes no meio na superfície de sua parede celular e bioacumulá-los em organelas ou ligá-los a proteínas em seu interior celular (BRAND, 2006).

Kodama et al. (2001) testaram o crescimento e potencial de biodegradação do fungo *P. steckii* DS6F em meio de cultivo contendo o herbicida simazine como fonte de carbono e nitrogênio. Em seu estudo, observaram que o fungo foi capaz de crescer no meio de cultivo, entretanto, a adição de extrato de levedura ao meio possibilitou um maior desenvolvimento do fungo. A maior degradação do simazine ocorreu em pH em torno de 4 e 8 a 30°C. A degradação máxima registrada do poluente foi de 53% em cinco dias de experimento no reator contendo glicose.

Barnabé (2003) estudou a ação descontaminante dos herbicidas PQT e diquat pelo fungo *P. ostreatus* e verificou uma resistência e crescimento dos fungos e biodegradabilidade dos herbicidas. Das quatro linhagens de *P. ostreatus* testadas, a CCB004 e a 021 se mostraram potencialmente capazes de sobreviver e resistir a esse ambiente.

Bhalerao e Puranik (2007) realizaram um estudo para selecionar uma linhagem de fungo, entre 16 selecionadas, capaz de biodegradar o pesticida endosulfan. Em um experimento inicial para investigar o crescimento fúngico, a espécie que apresentou tolerância ao meio rico em poluente foi *Aspergillus niger*. Logo, os autores desenvolveram ensaios de fermentação submersa de 144 horas e observaram uma queda do pH para a faixa ácida seguido de completa degradação do pesticida em 120 horas de fermentação.

Colla et al. (2008) realizaram um estudo para verificar o crescimento dos fungos *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* em solo contaminado com herbicidas triazínicos. Os autores observaram que as espécies que mais cresceram e se adaptaram ao meio foram *Aspergillus* e *Penicillium*.

Hai et al. (2012) desenvolveram uma pesquisa objetivando o tratamento biológico, utilizando fungos e bactérias, de efluente contendo três pesticidas: aldicarbe, atrazina e alacloro. Após o período de 14 dias, os autores obtiveram remoções máximas, respectivamente, de 82, 77 e 67% com cultura mista e 79, 81 e 59% em reatores com cultura fúngica. Na conclusão do trabalho também foi citado que as altas remoções de pesticidas foram alcançadas, provavelmente, devido ao processo de biodegradação ter ocorrido juntamente com a biossorção dos pesticidas.

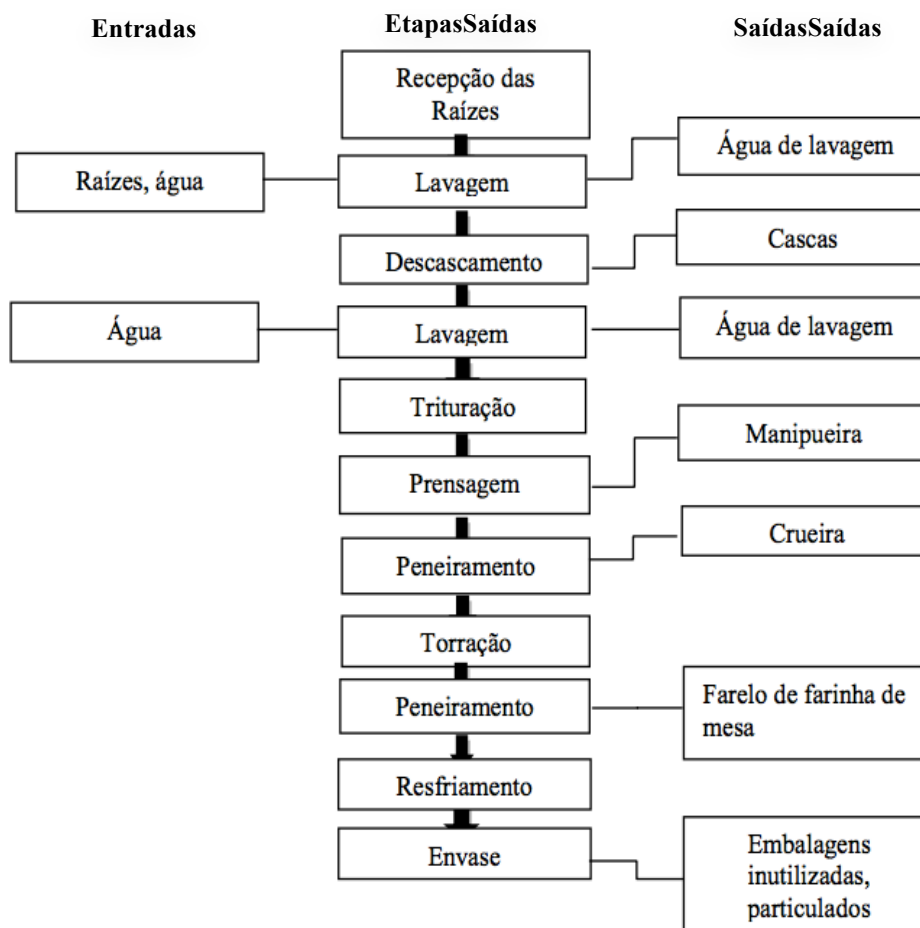
3.2 Produção fúngica de celulase a partir de casca de mandioca

3.2.1 Casca de mandioca

Segundo a Portaria nº 554 de 30 de Agosto de 1995, o Ministério de Estado da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária aprova a Norma de Identidade, Qualidade, Acondicionamento, Armazenamento e Transporte da Farinha de Mandioca, a qual define a casca de mandioca como a película que envolve a camada protetora da raiz ou entrecasca (BRASIL, 1995). De acordo com Caldas Neto et al. (2000), a casca de mandioca é um resíduo resultante da industrialização da mandioca para a produção de farinha proveniente das etapas de pré-limpeza e descascamento da raiz.

Durante o processamento industrial da mandioca (Figura 3) são gerados resíduos sólidos (casca, entrecasca e bagaço) e líquidos (água de lavagem e manipueira, líquido gerado na prensagem da mandioca), os quais resultam em grandes problemas ambientais, uma vez que o processo de extração da fécula de mandioca ainda carece de avanços tecnológicos (CAMARGO; LEONEL; MISCHAN, 2008).

Figura 3 - Fluxograma do beneficiamento de raízes de mandioca para a produção de farinha e fécula.



Fonte: SEBRAE, 2006.

Esse resíduo é composto de casca, entrecasca, pontas de mandioca e elevado teor de umidade (85%), correspondendo a cerca de 2-5% do peso total da raiz de mandioca (TAKAHASHI; FAGIOTO, 1990; MICHELAN et al., 2006).

Nas fecularias, a casca da mandioca é produzida em grandes quantidades, cerca de 50 kg são resultantes do processamento de cada tonelada de mandioca (LEONEL; CEREDA, 2000). Logo, se a produção brasileira de mandioca na safra de 2015 foi de 24 milhões de toneladas, então a produção de casca foi de 1,2 milhões de toneladas.

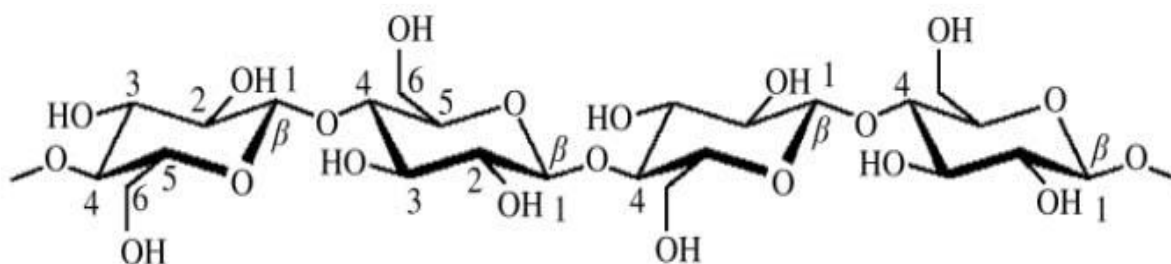
De acordo com Prado et al. (2006), os valores da composição química da raiz de mandioca e de seus resíduos não são homogêneos e padronizados. A casca de mandioca é um resíduo com baixa quantidade de proteínas, alto valor energético, baixo teor de cinzas e boa quantidade de fibras (lignina, celulose e hemicelulose), cerca de 25% (FARIA et al., 2011).

Com o intuito de agregar valor a esse resíduo agroindustrial refletindo na sustentabilidade ambiental, a casca de mandioca vem sendo bastante utilizada como matéria-prima na composição de ração animal, produção de energia, biorremediação de águas contaminadas, bem como na produção de enzimas, uma vez que é um material de baixo custo e de grande disponibilidade devido à grande quantidade gerada na produção brasileira de mandioca (SILVA et al., 2002; GUIMARÃES, 2012, OLIVEIRA NETO et al., 2013; DA CRUZ et al., 2015; SCHWANTES et al., 2015).

3.2.2 Celulose

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polímero de cadeia longa composto por várias moléculas de glicose. É formada por múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila das distintas cadeias justapostas de glicose, o que lhe confere uma estrutura fibrosa que compõem a parede celular dos vegetais. A molécula de celulose (Figura 4) é constituída pela união de moléculas de β -glicose através de ligações β -1,4-glicosídicas (KLEMM et al., 2001; SHI et al., 2014).

Figura 4 - Representação da molécula de celulose.

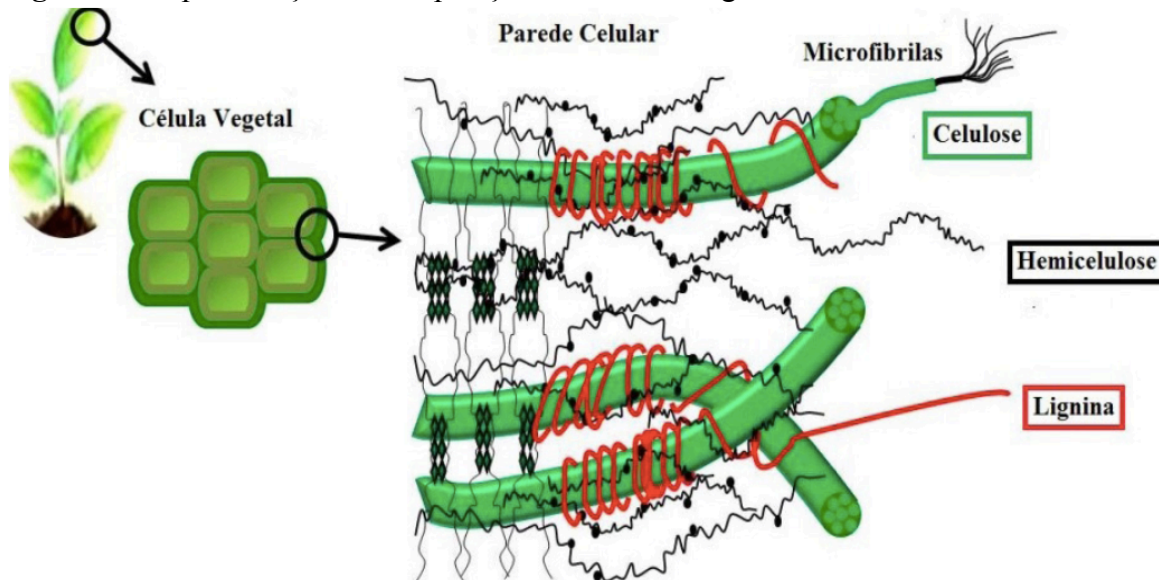


Fonte: Klemm et al. (2001).

As biomassas lignocelulósicas são compostas, basicamente, por três principais frações poliméricas: lignina, celulose e hemicelulose (Figura 5) (JEFFRIES; JEGUER, 1990). Essas frações são responsáveis por 97-99% de toda a massa seca dos materiais. Internamente, as fibrilas da fração celulósica encontram-se dispostas como espirais, conferindo-lhe força e flexibilidade. Essa fração encontra-se envolvida pela lignina, polímero aromático heterogêneo formado por ligações éter biologicamente estáveis, cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração, a hemicelulose, atua como um elo químico entre a celulose e a lignina, apresentando natureza heteropolissacarídica ramificada, formada, principalmente, por pentoses (xilose, raminose e arabinose), hexoses

(glicose, manose e galactose), ácidos urônicos (ácidos 4-O-metilglucurônico e galacturônico) e radicais acetila. Essas características resultam em materiais flexíveis, porém altamente resistentes a espécies químicas (RAMOS, 2003).

Figura 5 - Representação da composição de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptada de Tomme; Warren; Gilkes (1995).

A celulose possui diversas aplicações nas indústrias têxteis, indústrias de papel e papelão, indústrias químicas, as quais utilizam a polpa de celulose para produzir celofane, explosivos, acetato de celulose, carboximetilcelulose (lubrificantes e emulsificantes), tendo sua utilização também no ramo energético, uma vez que o açúcar produzido a partir da hidrólise da celulose é fermentado a etanol (NISHIYAMA et al., 2002). Outra aplicação bastante rentável desse polímero é a sua utilização como principal substrato para a produção de enzimas celulolíticas, as quais catalisam sua hidrólise (CASTRO; PEREIRA, 2010).

3.2.3 Enzimas celulolíticas

As enzimas são catalisadores biológicos proteicos responsáveis pelas reações químicas do metabolismo dos seres vivos (WRIGHT; WYMAN; GROCHMANN, 1988). O uso de enzimas tem sido muito empregado em substituição aos catalizadores químicos por apresentarem maior eficiência. A grande maioria das enzimas utilizadas em setores industriais como têxtil, farmacêutico, alimentício, indústrias de detergentes, indústrias de panificação, cervejarias (Tabela 2) são enzimas extracelulares de origem microbiana (GUPTA et al., 2003).

Tabela 2 - Aplicações de enzimas em diversos setores industriais.

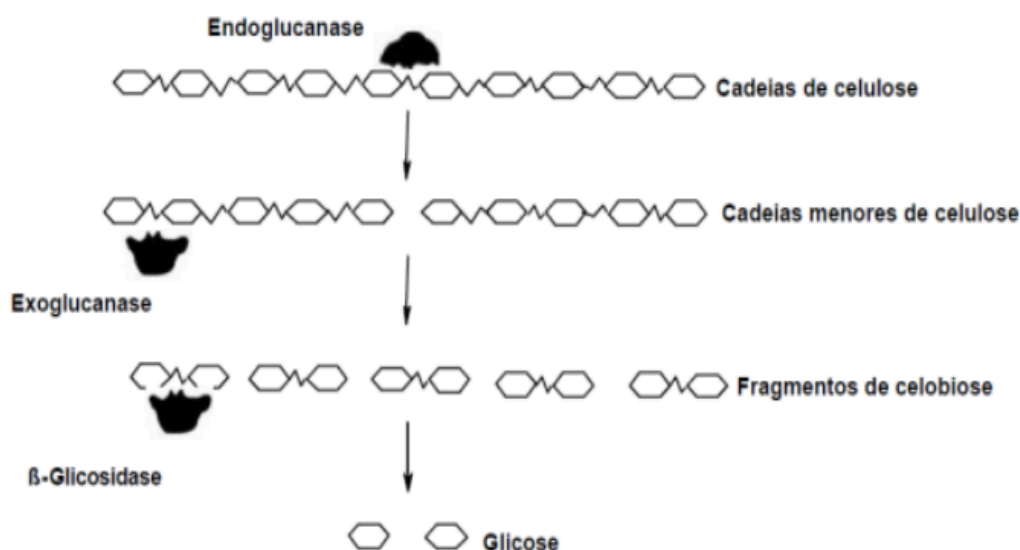
Enzimas	Bioconversão	Aplicações
α -amilase bacteriana	Amido $\rightarrow$ xarope de dextrose	Hidrólise do amido, cervejarias, detergentes e confeitarias
α -amilase fúngica	Amido $\rightarrow$ xarope de dextrose	Produção de maltose
Pululanase	Amido $\rightarrow$ xarope de dextrose	Produção de xarope de glicose
Xilanase	Polpa de papel $\rightarrow$ xilana + lignina	Indústria de papel
Quitinase	Quitina $\rightarrow$ quitobiose	Produção de alimentos, cosméticos, farmacêuticos, agroquímicos
Celulase	Celulose $\rightarrow$ glicose	Hidrólise da celulose, degradação de polímeros em detergentes
Lipase	Hidrólise de gorduras $\rightarrow$ Interesterificação	Laticínios, detergentes, farmacêuticos, cosméticos, óleos
DNA polimerase	Amplificação do DNA	Engenharia genética/PCR

Fonte: Haki; Rakshit (2003).

As celulasas estão entre as principais enzimas utilizadas em âmbito industrial devido às suas inúmeras aplicações (WARD, 1989; ABEER et al., 2014). O desenvolvimento de enzimas com propriedades melhoradas empregando técnicas de baixo custo tem despertado interesse por grande parte das indústrias, visando maior economia e eficiência enzimática sem comprometer a estabilidade e integridade delas (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006; ABEER et al., 2014).

Celulasas são enzimas responsáveis pela hidrólise de materiais celulósicos. Essas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para romper ligações químicas existentes entre as unidades de glicose liberando açúcares, como oligossacarídeos e moléculas de glicose (WRIGHT; WYMAN; GROCHMANN, 1988). Atuam em diferentes regiões da celulose (Figura 6) e são divididas em três categorias: endoglucanases, as quais clivam ligações glicosídicas presentes na região interna da molécula de celulose; exoglucanases, são capazes de romper exclusivamente ligações situadas na região externa da molécula; e as β -glicosidases, as quais hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis à glicose (KLEMAN-LEYER et al., 1996).

Figura 6 - Representação da hidrólise da celulose pela ação de enzimas celulolíticas.



Fonte: Adaptado de Wright; Wyman; Grochmann (1988).

As endoglucanases recebem a seguinte nomenclatura de acordo com a “*Enzyme Comission of the International Union of Biochemistry*”: 1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.4; na qual “EC” significa *Enzyme Comission* e os números representam classe, sub-classe, grupos químicos específicos que participam da reação e a enzima propriamente dita na ordem da esquerda para direita (MONTEIRO; SILVA, 2009). Responsáveis por iniciar a hidrólise, as endoglucanases são enzimas específicas da degradação da celulose que catalisam a quebra das ligações glicosídicas localizadas no interior desse polímero, liberando oligossacarídeos e formando novos terminais (KLEMAN-LEYER et al., 1996).

As exoglucanases, também chamadas de exo-1,4- β -D-glucanase ou celobiohidrolase, cuja nomenclatura é EC 3.2.1.91, são responsáveis por catalisarem a quebra das ligações a partir da extremidade não redutora da molécula de celulose, produzindo celobiose (compostos menores constituídos por duas moléculas de glicose). As celobiohidrolases e glucano-hidrolases são exemplos de exoglucanases (KLEMAN-LEYER et al., 1996; ZHANG; LYND, 2004).

As β -glicosidases, ou β -glicosídeo gluco-hidrolases (EC 3.2.1.21), possuem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis liberando glicose. É importante que todas as enzimas do complexo celulolítico atuem em sinergia, uma vez que o rendimento é melhor quando comparado com a soma dos rendimentos individuais (KLEMAN-LEYER et al., 1996; ZHANG; LYND, 2004).

Essas enzimas apresentam diversas aplicações biotecnológicas, como na indústria têxtil, utilizadas na fabricação de jeans e no amaciamento de tecidos; em indústrias de bebidas, para a produção de sucos de frutas e em processos de vinificação; na produção de vinhos, utilizadas na extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva; na fabricação de detergentes, proporcionando maior limpeza e menor degradação dos tecidos; em indústrias de polpa de celulose e papel, tornam o papel mais branco e liso; e também são aplicadas na nutrição animal, na qual aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal melhorando a conversão do alimento ingerido em carne e leite (CASTRO; PEREIRA, 2010).

De forma geral, as celulasas produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6 – 5,0), enquanto que bactérias chegam a produzir celulasas altamente ativas em valores de pH alcalino. A temperatura ótima para celulasas fúngica é em torno de 40°C – 50°C (LIMA et al., 2010).

Diversos fatores influenciam a atividade enzimática da celulase, como temperatura, pH, tamanho do inóculo, fonte de carbono, presença de inibidores ou indutores, aeração e tempo de crescimento. Além desses, outros fatores relacionados ao substrato também influenciam a degradação da celulose como, cristalinidade, estrutura molecular, área superficial, grau de polimerização e acessibilidade a ligações glicosídicas (MUKHOPADHYAY; MALIK, 1980; COUGHLAN, 1985). A presença de outras moléculas também influenciam a atividade, seja para indução como para inibição. Íons, como mercúrio (Hg^{+2}), cobre (Cu^{+2}), argônio (Ag^{+}) e Zn^{+2} , apresentam efeito inibitório na atividade das enzimas, podendo provocar perda total da atividade catalítica mesmo estando presentes em concentrações tão baixas quanto 2 mM (AKIBA et al., 1995; LIMA et al., 2010).

3.2.4 Fungos filamentosos na produção de celulase

As espécies de *Aspergillus* possuem grande aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica. Esse fungo é considerado o melhor produtor de exo e endoglucanases apresentando grande vantagem nos processos de sacarificação de biomassas (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011). A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos que estudaram a produção fúngica de celulase a partir de biomassas agroindustriais.

Tabela 3 - Produção de celulases por fungos a partir de resíduos agroindustriais.

Micro-organismo	Substrato	Atividade enzimática	Referência
<i>Trichoderma harzianum</i>	Farelo e palha de trigo	18,0 FPU/gms	Deschamps et al. (1985)
<i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1	Bagaço de cana pré-tratado e farelo de trigo	32,9 FPU/gms	Camassola; Dillon (2007)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30	Bagaço de cana	0,66 U/mL	Mekala et al. (2008)
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Resíduos de arroz e maracujá	14,10 U/g	Rocha (2010)
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de soja	21,0 U/g	Rodríguez-Zuñiga et al. (2011)
<i>Myceliophthora</i> sp. M77	Farelo de trigo + farelo de soja	10,3 FPU/gms	Afonso (2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana-de-açúcar + farelo de arroz	3,1 U/g	Ramadan et al. (2014)

Fonte: Autor (2016).

Deschamps et al. (1985) estudaram o fungo *Trichoderma harzianum* na produção de celulase utilizando uma mistura de palha de trigo (80%) e farelo de trigo (20%) em reator de tanque agitado. As condições ótimas registradas foram: 74% de umidade, pH 5,8, 66 horas de cultivo e 18 FPU/gms.

Camassola, Dillon (2007) avaliaram a produção de celulase por *Penicillium echinulatum* 9A02S1 em testes de fermentação em estado sólido utilizando como fontes de carbono concentrações distintas de bagaço de cana pré-tratado e farelo de trigo. Os autores concluíram no 4º dia o valor máximo de celulase, 32,9 FPU/gms.

No trabalho de Mekala et al. (2008), o bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como substrato para a produção de celulase utilizando *Trichoderma reesei* RUT C30, e os parâmetros de cultura foram otimizados para melhorar o rendimento enzimático. Os resultados mostraram uma produção de celulase máxima de 0,66 U/mL em temperatura de 33°C e o tempo de incubação de 67 horas.

A produção das enzimas amilase, celulase, invertase, pectinase e protease foi investigada por Rocha (2010) através de fermentação no estado sólido com *Aspergillus niger* empregando resíduos do processamento de arroz e maracujá. Nos ensaios realizados, variou-se a temperatura entre 28 - 45°C, obtendo maior produção de celulases (14,10 U/g) à 45°C no 12º dia de fermentação.

Rodríguez-Zuñiga et al. (2011) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de trigo e misturas entre os substratos como fonte de carbono na fermentação em estado sólido para produção de celulases por *Aspergillus niger* à temperatura de 32°C durante 4 dias. O valor máximo da atividade de celulase total (0,4 UI/g) foi verificado no substrato

composto por 60% de farelo de soja e 40% de bagaço de cana-de-açúcar, atividade 12 vezes maior que a obtida com 100% de bagaço de cana-de-açúcar (0,03 UI/g).

Afonso (2012) observou a atividade da celulase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp. M77 realizando ensaios em reator de leito fixo nas temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C. As fontes de carbono utilizadas foram farelos de trigo e de soja. A máxima produção enzimática registrada foi 10,3 FPU/gms, porém os resultados indicaram que houve desnaturação térmica a 60°C e 70°C e que a concentração de glicose de 1 g/L no meio pode ter inibido a ação da enzima.

Barbosa (2012) estudou a produção de celulases por *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* por bateladas simples com reciclo e registrou valores enzimáticos máximos de 0,57 e 0,72 FPU/mL, respectivamente.

Ramadan et al. (2014) investigou a capacidade de produção de celulases a partir de bagaço de cana-de-açúcar e farelo do beneficiamento de arroz, tratados com explosão a vapor através de fermentações em estado sólido com *Aspergillusniger*. Os experimentos foram realizados em bateladas agitadas contendo 10^7 a 10^8 células/g de resíduo durante 72 h a 30°C. A produção enzimática máxima obtida foi de 3,1 U/g.

3.3 Produção de α -amilase a partir de substrato de mandioca

3.3.1 Mandioca

A mandioca, cuja espécie chama-se *Manihot esculenta* Crantz (Figura 7), apresenta-se na forma tuberosa amilácea. Em virtude de sua fácil propagação, tolerância à déficit hídrico, tolerância à solos de baixa fertilidade, resistência a doenças e a ambientes edafo-climáticos (FIORDA et al., 2013), a mandioca é de fundamental importância na alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas em todo o mundo sendo cultivada em mais de 90 países (CAMARGO; LEONEL; MISCHAN, 2008).

Figura 7 - Raízes de mandioca.

Fonte: Autor (2016).

A cultura da mandioca é totalmente aproveitada (Tabela 4), tanto a parte aérea (folhas e hastes) (Figura 8) quanto a raiz. As folhas são utilizadas na alimentação humana e animal por serem ricas em proteínas e aminoácido lisina. As hastes são aproveitadas na alimentação animal sob a forma de silagens, fenos e *in natura*. Já as raízes são destinadas à alimentação humana, animal e também às indústrias para a produção de féculas, farinhas e energia (BRASIL, 2014).

Tabela 4 - Usos e utilidades da mandioca.

Parte aérea	Folhas	Alimentação animal e humana		
	Hastes	Alimentação animal (silagens, fenos e <i>in natura</i>)		
	Alimentação humana	Cozidas, fritas, bolos, biscoitos, pães, tortas, cremes		
	Alimentação animal	Cruas, cozidas, desidratadas (farinhas, raspas e <i>pellets</i>)		
Raiz	Indústria	Amido (fécula)	Uso alimentício (nativo e modificado)	Glucose, maltose, féculas, gelatinas
			Amido industrial (nativo e modificado)	Adesivos, têxtil, papel e celulose, farmacêutica, explosivos
			Amido fermentado	Confeitarias, padarias
		Farinhas	Consumo humano	Farinha de mesa
			Consumo animal	Farinha panificada
		Raspas	Farinhas de raspas	Alimentação animal
			Consumo animal	Alimentação humana
		Álcool	Combustíveis, desinfetantes, bebidas	

Fonte: Adaptado de Brasil (2014).

Figura 8 - Parte aérea com folhas e hastes da mandioca utilizada nessa pesquisa.



Fonte: Autor (2016).

Apesar da carência em proteínas e alguns nutrientes, a raiz de mandioca contém outros compostos importantes à alimentação, como cálcio (50 mg/100 g), fósforo (40 mg/100 g) e vitamina C (25 mg/100 g) (BRASIL, 2014).

A mandioca é uma das principais culturas alimentares do setor agroindustrial no mundo e no Brasil. O continente africano se destaca na produção mundial, no qual a Nigéria é o maior produtor de mandioca, com 56 milhões de toneladas na safra de 2015 (FAO/SEAB, 2015). O Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), na safra de 2015, foi o quarto maior produtor mundial de raiz de mandioca, com 24 milhões de toneladas, o que corresponde a um aumento próximo a 0,65% com relação à safra 2014 e um aumento de 9,5% com relação à safra 2013, que foi de 21,2 milhões de toneladas. (IBGE; SEAB/DERAL, 2015).

Na safra de 2015, na Região Nordeste do Brasil, o principal produtor de mandioca é o Estado da Bahia, com 2,1 milhões de toneladas. A Região Nordeste é a segunda maior produtora nacional de mandioca, com cerca de 6,0 milhões de toneladas, ficando atrás apenas da região Norte, cujo Estado do Pará é o principal produtor brasileiro, com 5,1 milhões de toneladas. Com 448 mil toneladas de mandioca produzidas na mesma safra, o Ceará é o terceiro maior produtor do território nordestino (IBGE; SEAB/DERAL, 2015).

A cultura também se destaca no setor energético, uma vez que é fonte de produção de etanol (LEONEL; CEREDA; ROAU, 1999; SALLA et al., 2010), plásticos

biodegradáveis, além de usos no setor têxtil, cosmético e alimentício (humano e animal) (FUNGULANI, 2001; FIORDA et al., 2013).

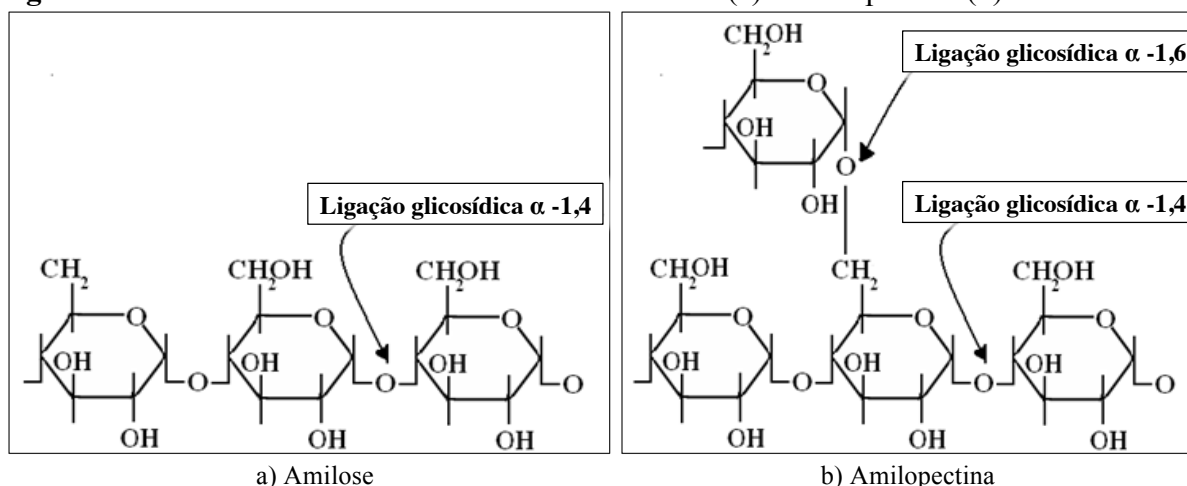
Rattanachomsri et al. (2009), afirmam que devido à sua composição química, rica em amido, baixo conteúdo de cinzas, fácil hidrólise, baixo custo de cultivo e falta de competição com outros usos industriais, a mandioca e seus resíduos são substratos ideais para a produção de produtos de alto valor agregado, como enzimas amilolíticas produzidas por processos biotecnológicos.

3.3.2 Amido

Principal polímero de reserva energética dos vegetais formado por unidades de glicose através de ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e α -1,6. Essas ligações se mantêm estáveis em pH elevado, porém, em pH baixo elas se rompem liberando monossacarídeos como a glicose, oligossacarídeos como a maltose e polissacarídeos como as dextrinas (WARD, 1989).

O amido é formado por dois polissacarídeos: a amilose, constituindo cerca de 20% a 25% da molécula de amido, e a amilopectina, compondo 80-85% da molécula do polímero. O primeiro é insolúvel em água, enquanto que o último é facilmente solúvel. A amilose é formada por cerca de 6000 unidades de glicose ligadas de forma linear por ligações glicosídicas do tipo α -1,4 (Figura 9a). Já a amilopectina consiste em 10 a 60 unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -1,4 mais 15 a 45 unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -1,6 (VAN DER MAAREL et al., 2002).

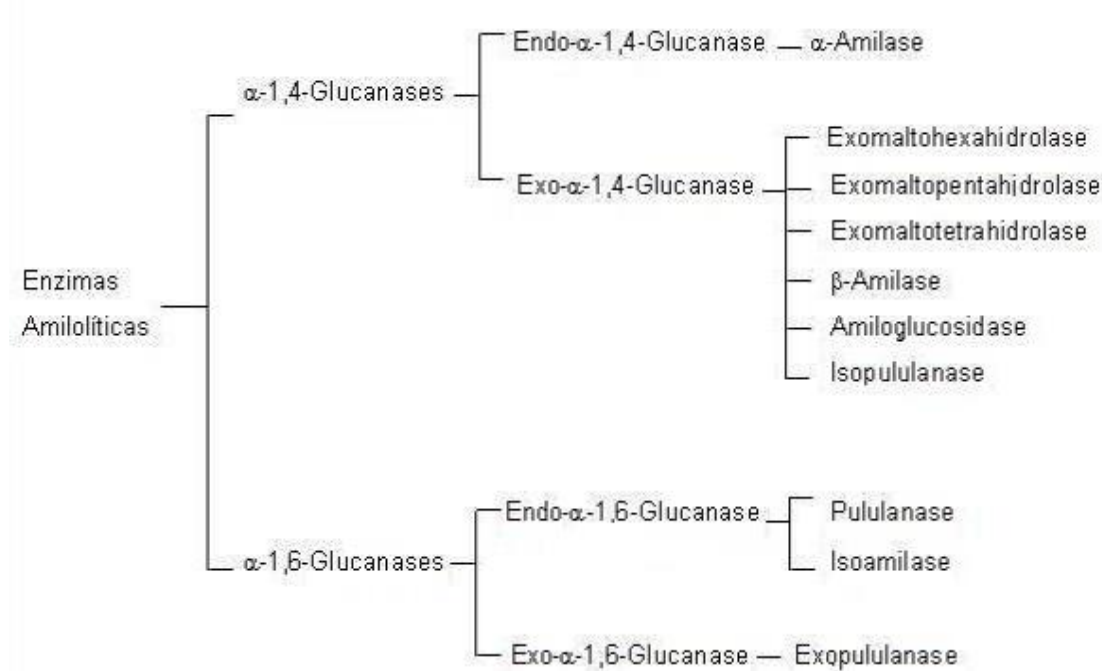
Figura 9 - Estrutura das cadeias moleculares da amilose (a) e amilopectina (b).



Fonte: El-Fallal et al. (2012).

O amido possui diversas aplicações na indústria têxtil, indústria de papel, cervejarias, tendo sua maior utilização no ramo alimentício, farmacêutico e energético, uma vez que o açúcar produzido a partir da hidrólise do amido pode ser fermentado para a produção de etanol (CRABB; SHETTY, 1999). Outra aplicação bastante rentável desse carboidrato é a sua utilização como principal substrato para a produção de enzimas amilolíticas (Figura 10), as quais catalisam a hidrólise do polímero (NIGAM; SINGH, 1995).

Figura 10 - Classificação das enzimas amilolíticas responsáveis pela degradação do amido.



Fonte: Nigam;Singh (1995).

3.3.3 Enzimas amilolíticas

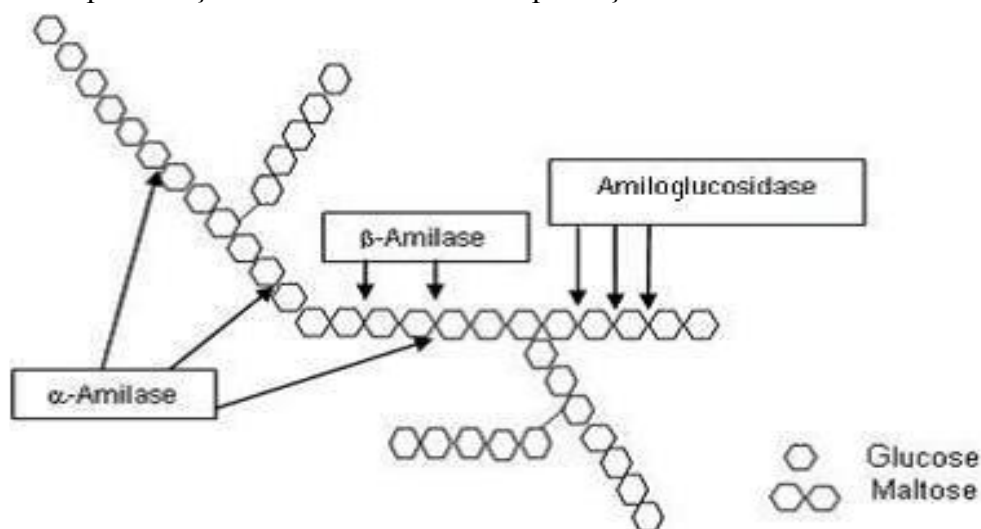
As amilases estão entre as principais enzimas utilizadas em âmbito industrial devido às suas inúmeras aplicações como, conversão do amido em açúcares, produção de ciclodextrinas no setor farmacêutico, produção de bebidas alcoólicas por processos de fermentação em cervejarias (WARD, 1989; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006). O desenvolvimento de enzimas com propriedades melhoradas empregando técnicas de baixo custo tem despertado interesse por grande parte das indústrias, visando maior economia e eficiência enzimática sem comprometer a estabilidade e integridade delas (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

Devido a sua função de hidrolisar o amido, as amilases são comumente utilizadas pelos animais na digestão desse polímero presente nos alimentos; pelas plantas, atuando na degradação do amido presente nas raízes; e pelos micro-organismos que utilizam o polissacarídeo como fonte energética (PEIXOTO et al., 2003).

As amilases podem ser divididas em duas categorias: endoamilases e exoamilases. As endoamilases, como as α -amilases, clivam as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na região interna da molécula de amido (Figura 11) resultando na formação de dextrinas (polissacarídeo de baixo peso molecular formado por uma mistura de polímeros D-glicose) (VAN DER MAAREL et al., 2002).

As exoamilases são capazes de romper exclusivamente as ligações α -1,4, como é o caso das β -amilases que liberam oligossacarídeos de diferentes tamanhos (como a maltose), como também podem clivar ambas as ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades de terminais não redutores da molécula de amido, como as glicoamilases ou amiloglicosidases e as α -D-glicosidases, as quais formam como subprodutos moléculas de glicose (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Figura 11 - Representação de hidrólise do amido pela ação de enzimas amilolíticas.



Fonte: Van Der Maarelet al. (2002).

As α -amilases recebem a seguinte nomenclatura de acordo com a “*Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*”: E.C 3.2.1.1 ou 1,4- α -D-glucano glucanohidrolase, na qual “E.C” significa *Enzyme Commission* e os números representam

classe, sub-classe, grupos químicos específicos que participam da reação e a enzima propriamente dita na ordem da esquerda para direita (MONTEIRO; SILVA, 2009).

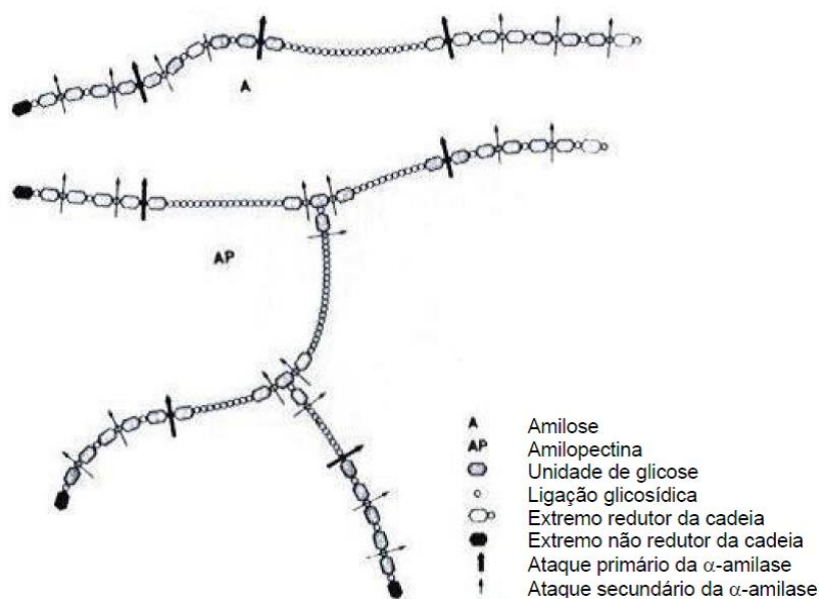
Encontradas em animais, vegetais e micro-organismos, as α -amilases (Figura 12) são enzimas específicas da degradação do amido que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 (Figura 13) localizadas no interior desse polímero liberando dextrinas como subprodutos. Também chamada de enzimas dextrinizantes, elas se dividem em dois grupos: as α -amilases liqueficientes, as quais degradam de 30% a 40% do amido, e as α -amilases sacarificantes, responsáveis pela hidrólise de 50% a 60% do substrato (VIHINEN; MANTSALA, 1989).

Figura 12 - Estrutura da α -amilase.



Fonte: Sivaramakrishnan et al. (2006).

Figura 13 - Ataque das α -amilases sobre a amilose e amilopectina da molécula de amido.



Fonte: Bruchmann (1980).

As α -amilases fazem parte de uma família de enzimas composta por aproximadamente 30 enzimas específicas diferentes, porém é necessária uma combinação dessas enzimas para completa quebra do polímero em glicose (GUPTA et al., 2003; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

Para apresentarem uma boa atividade enzimática, as α -amilases requerem, principalmente, a presença de íons cálcio (Ca^{2+}) como cofator para garantir sua estabilidade, integridade e completa ativação. A quantidade de cálcio existente na molécula de amido já é suficiente para suprir a necessidade das enzimas, porém a adição desses íons no meio fermentativo ainda é importante para alcançar uma máxima proteção das enzimas contra a desnaturação pelo calor (BORDBAR; OMIDIYAN; HOSSEINZADEH, 2005).

Em vista à grande demanda industrial dessas enzimas e devido seu alto custo de produção, uma das alternativas à produção de α -amilases é a obtenção dessas enzimas por bactérias e fungos via processos fermentativos submerso e/ou estado sólido (Tabela 5) utilizando matéria-prima rica em amido, basicamente, uma vez que há uma grande variedade de substratos de fácil disponibilidade e baixo custo (ACUÑA-ARGUELLES et al., 1995; GONÇALVEZ, 2006; ALVA et al., 2007; RAY et al., 2008; FREITAS; MARTINS; FERREIRA, 2014; DA CRUZ et al., 2015).

Tabela 5 - Substratos utilizados para a obtenção de enzimas α -amilases fúngica e bacteriana através de fermentação em estado sólido e submersa.

Microrganismos	Processo fermentativo	Material utilizado	Condições ótimas	Prod. de α -amilases	Referências
<i>Rhizopus ssp. e Aspergillus niger</i>	FES e FSm	Fécula de mandioca	pH= 4,0; 30°C; 60h	467,46U/g	Spier (2005)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842	FES	Farelo de trigo	37°C; pH= 4,0; 72h	62470 U/g	Gangadharan et al. (2006)
<i>Aspergillus oryzae</i>	FES	Farelo de trigo	30°C; pH= 5,0; 72h	15095 U/g	Sivaramakrisnan et al. (2006)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23842	FSm	Farelo de trigo	37°C; pH= 4,0; 42h	965,9 U/mL	Gangadharan et al. (2008)
<i>Bacillus brevis</i> MTCC 7521	FES	Bagaco de mandioca	50°C; 36h	23050 U/g	Ray et al. (2008)
<i>Aspergillus niveus</i>	FSm	Casca de mandioca	pH= 6,0; 40°C; 72h	395 U/g	Da Silva (2009)
<i>Streptomyces erumpens</i> MT 731	FES	Amido de mandioca	50°C; 60h	3437 U/mL	Kar; Data; Ray (2010)

Fonte: Autor (2016).

Os principais micro-organismos produtores de α -amilases são os fungos do gênero *Aspergillus* e bactérias *Bacillus* devido à facilidade de cultivo e às desejáveis propriedades físico-químicas das enzimas (PANDEY et al., 2005). Segundo Moreira et al. (1999), a temperatura ótima para produção de α -amilases é 60°C, apresentando máxima produção com um pH= 6,0.

3.3.4 Fungos na produção de α -amilase por fermentação submersa (FSm)

Segundo Rodrigues e Santanna (2001), a principal característica da FSm é a utilização de meio líquido com nutrientes solúveis, no qual os micro-organismos se desenvolvem. Na FSm, o conteúdo de água livre é superior a 95%, enquanto que na fermentação em estado sólido, a água presente varia de 40% a 70%.

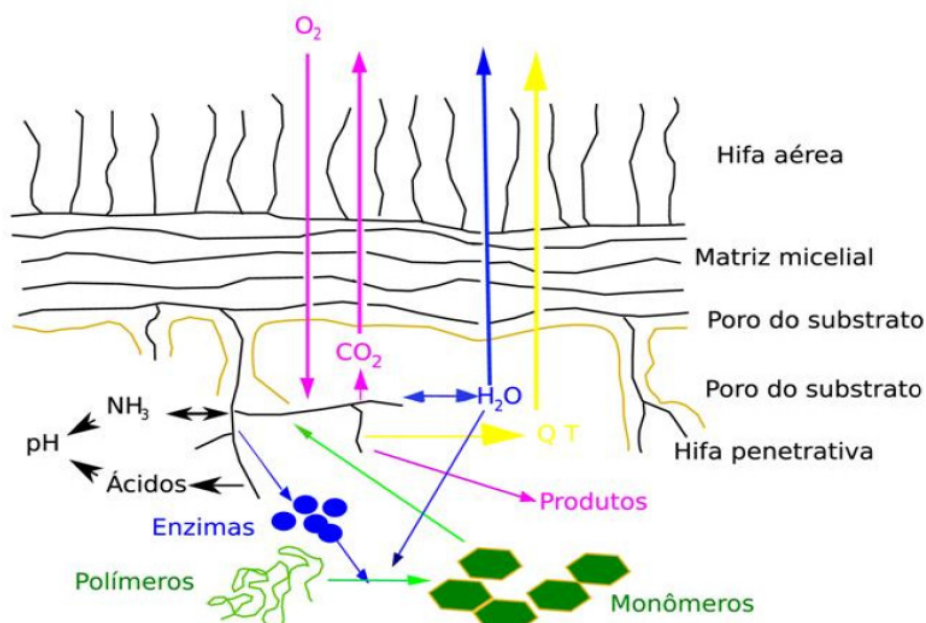
Em escala industrial, a FSm é mais usual que a fermentação em estado sólido devido à facilidade de controle dos parâmetros como temperatura, pH, aeração e agitação do meio; à facilidade de cultivo; à melhor homogeneização do meio, o que resulta em uma melhor transferência de massa. Porém, a grande quantidade de água no meio fermentativo facilita a contaminação por outros microrganismos (LIMA et al., 2001).

Para a produção de enzimas, a FSm é mais indicada em função da facilidade de extração das enzimas extracelulares do meio fermentado e da determinação da biomassa e cinética de crescimento biológico, pois a fração sólida é utilizada para a análise de determinação de sólidos totais e a fração líquida para determinação de atividade enzimática (ROITMAM et al., 1988).

De acordo com Pereira (2007), algumas vantagens da FSm podem ser citadas como a facilidade no controle de parâmetros do processo, os microrganismos são submetidos às mesmas condições físico-químicas devido à homogeneidade do meio, melhor absorção e aproveitamento dos nutrientes e variedade de insumos produzidos como, álcool etílico, enzimas, insulinas, bebidas alcóolicas, antibióticos.

O modo básico de crescimento dos fungos (Figura 14) é uma combinação de extensão apical das pontas das hifas e a geração de novas pontas por meio de ramificações. A estrutura da parede celular fúngica acoplada à extremidade e à ramificação do micélio garante uma estrutura firme e sólida (RAIMBAULT, 1998).

Figura 14 - Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos.



Fonte: Adaptado de Holker; Lenz (2005).

As enzimas hidrolíticas são excretadas pelas pontas das hifas, sem grande diluição, o que faz com que a ação enzimática seja mais eficiente e permita sua penetração para a maioria do substrato (RAIMBAULT, 1998).

Diversos microrganismos foram utilizados em processos fermentativos para a produção de enzimas, como *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Rhizopus sp.* (MOREIRA et al., 2001; FRANCIS et al., 2003; GANGADHARAN et al., 2006; SPIER, 2005; SIVARAMAKRISNAN et al., 2007; RAY et al., 2008; GANGADHARAN et al., 2008; DA SILVA, 2009; KAR; DATA; RAY, 2010). Devido às vantagens do emprego de *Aspergillus niger* em processos fermentativos para a produção enzimática, como a simplicidade de manipulação, secretor de proteínas, habilidade de fermentar diversas fontes de carbono, produtor de elevada variedade de bioprodutos e ainda, capacidade de sobrevivência em ampla faixa de pH (entre 2 e 9), essa espécie fúngica é excelente produtora de enzimas amilases (SPIER, 2005).

De acordo com Sundurram et al. (2014), o *Aspergillus niger* apresenta melhor crescimento e melhor produção de amilases em temperaturas entre 25°C e 37°C, com uma temperatura ótima de 30°C. O pH favorável para a produção dessa enzimas é entre 5,0 e 6,0 em processo fermentativo submerso.

Somkuti e Steinberg (1980) utilizaram farelo de trigo como fonte de carbono na fermentação submersa para produção de α -amilase por *Mucor pusillus* à temperatura de 34°C. O pH e temperatura ótimos encontrados foram 3,5-4,0 e 70°C. A produção enzimática foi inibida pela presença de íons magnésio (Mg^{2+}), cálcio (Ca^{2+}) e cobre (Cu^{2+}).

A caracterização de uma α -amilase produzida por *Aspergillus oryzae* foi realizada por Carlsen e colaboradores (1996) utilizando glicose como fonte de carbono a 30°C. O pH ótimo encontrado foi 6,0.

Moreira et al. (2001) estudaram diversas espécies de *Aspergillus* para a produção de α -amilase por fermentação submersa utilizando α -metil-glicosídeo como substrato. As condições ótimas encontradas foram: período de fermentação de 288 horas, temperatura de 30°C para produção máxima de 35 U/mL.

Nguyen et al. (2002) constataram que a melhor produção de enzimas α -amilase e amiloglicosidase ocorreu em 48 horas de fermentação, pH= 5,5 e 5,0, respectivamente, com temperatura ótima para ambas de 70°C. Concluíram também que o íon zinco (Zn^{2+}) presente no meio foi inibidor à produção enzimática, por outro lado, a presença dos íons magnésio, cálcio, ferro e bário resultou em um aumento da atividade das enzimas.

Silva et al. (2005) utilizaram amido solúvel, farelo de trigo e farinha de mandioca e resíduo do processamento da mandioca como fonte de carbono para a produção de amilases sacarificantes e dextrinizantes a partir do fungo *Rhizomucor pusillus*. As amilases dextrinizantes e sacarificantes exibiram atividades ótimas em pH entre 4,0-4,5 e 5,0, respectivamente e temperatura ótima de 75°C para ambas. A presença de cálcio no meio afetou a produção da amilase sacarificante, mas foi insignificante para a dextrinizante com uma produção de 8,0 U/mL. A atividade sacarificante máxima foi 14 U/mL.

A produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* foi investigada por Esfahanibolandbalaie e colaboradores (2008). O melhor pH encontrado foi 6,7 e temperatura ótima de 35°C, porém, a adição de glicose no meio inibiu a produção.

Ertan et al. (2014) estudaram o efeito de diferentes concentrações de glicose inicial (10, 20, 40, 80 e 160 mg/mL) no processo de fermentação submersa por *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium griseofulvum* para produzir α -amilase e concluíram que a presença de glicose inibiu a produção enzimática, obtendo uma produção máxima de 662 U/mL e 400 U/mL, respectivamente, sem adição de glicose.

Khalaf, Alam e Salleh (2014) investigaram a melhor fonte de carbono e nitrogênio para promover a produção de α -amilase por *Aspergillus niger* O103A e concluíram que a maltose e o extrato de levedura foram as melhores fontes, respectivamente, resultando numa produção de 49 U/mL de enzima.

Celestino et al. (2014) avaliaram a produção de α -amilase por *Aspergillus* 6V4 isolado da manipueira utilizando farelo de trigo como substrato e encontraram uma produção enzimática máxima de 335 UI/L. Porém, a suplementação do meio fermentativo com peptona resultou no decréscimo enzimático.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico estão apresentadas as duas etapas da pesquisa que se dividem em Etapa I: Biodegradação fúngica do PQT e produção de celulase a partir da casca de mandioca, a qual se subdivide em preparação da casca de mandioca; cultivo do fungo *Aspergillus niger* AN 400, preparação da suspensão de esporos e contagem de esporos; testes de adsorção de PQT na casca de mandioca; e montagem, operação e monitoramento dos reatores para os ensaios de biodegradação de PQT e produção de celulase por bateladas aeradas com biomassa dispersa; e Etapa II: Produção de α -amilase a partir de substrato de mandioca, a qual se subdivide em preparação do substrato de mandioca; cultivo do fungo *Aspergillus niger* AN 400, preparação da suspensão de esporos e contagem de esporos; montagem dos ensaios de fermentação submersa para produção de α -amilase.

4.1 Etapa I: Biodegradação fúngica do paraquat e produção de celulase a partir da casca de mandioca

4.1.1 Preparação da casca de mandioca

A mandiocautilizada foi doada pelo Centro de Ensino e Treinamento em Extensão (CETREX), localizado em Caucaia, Ceará, BR,colhida na safra de maio de 2015. Inicialmente, 15 kg da raiz amilácea foram lavados com água corrente para remoção de areia e terra. Após a lavagem, as raízes de mandioca foram descascadas e as cascas foram trituradas em liquidificador (marca BRITÂNIA). Nessa fase, foram obtidos8,45 kg de mandioca descascada, 6,25 L de manipueira e 300 g de casca de mandioca úmida, o que corresponde a um rendimento de aproximadamente 3,55% de casca úmida. Posteriormente, foi realizada a secagem das cascas em estufa (marca QUIMIS) a 60°C por 24 horas obtendo aproximadamente 206 g de casca de mandioca seca, os quais foram acondicionados em local seco e em temperatura ambiente.A Figura 15está apresentado o fluxograma de preparação da casca de mandioca para sua utilização nos ensaios de biodegradação do PQT e produção de celulase total.

Figura 15 - Fluxograma da preparação da casca de mandioca para utilização nos ensaios de biodegradação de PQT e produção da enzima celulase.



Fonte: Autor (2016).

4.1.2 Cultivo do fungo *Aspergillus niger* AN 400 e preparação da suspensão de esporos

A espécie em estudo foi *Aspergillus niger* AN 400 sob a forma de suspensão de esporos, fornecida pelo LATAM. Na preparação dos inóculos foi realizada a produção de uma suspensão de esporos semeando a espécie em placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Ágar*). O meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos. As placas inoculadas com fungos permaneceram por sete dias em estufa microbiológica (marca BIOPAR) à temperatura de 28°C e ao final deste período foi observado o crescimento dos esporos por toda a placa, procedendo-se a remoção dos esporos com solução salina Tween 80 e água destilada estéril (SAMPAIO, 2005).

Para a contagem dos esporos foi preparada uma solução utilizando 50 µL da suspensão de esporos, previamente agitada em agitador tipo vórtex, acrescida de 950 µL de solução Tween 80, resultando em uma diluição de 1:20. Em seguida, foi transferida 20 µL da solução preparada para uma câmara de Neubauer onde se deu o procedimento de contagem

dos esporos em microscópio óptico (marca BIOVAL) (SAMPAIO, 2005) com aumento de 400 vezes para a determinação da concentração de esporos da suspensão utilizando a Equação 1.

$$C = N \times f \times V_{cam} \quad (1)$$

Onde: C é a concentração de esporos (esporos/mL), N é o número de esporos contados, f é o fator de diluição e V_{cam} é o volume total da câmara de Neubauer ($2,5 \times 10^5$ mL).

4.1.3 Testes de adsorção de PQT na casca de mandioca

Foram realizados ensaios de adsorção de PQT na casca de mandioca a fim de quantificar a massa de PQT adsorvida na casca. Para os testes foram utilizados 3 frascos de vidro de 4 L de volume útil, nos quais cada frasco continha 0,5, 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca seca, 30 mg/L de PQT. A capacidade máxima de adsorção do pesticida na casca de mandioca, utilizada como material suporte, foi monitorada a partir da sua concentração inicial e final no meio durante um período de 35 minutos, obtendo alíquotas nos tempos 0, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos. Para calcular a massa de PQT adsorvido na casca foi utilizada a Equação 2 (DA SILVA, 2015).

$$m = (C_0 - C_e) \times V \quad (2)$$

Onde: m é a massa de PQT adsorvida (mg); C_0 é a concentração afluenta de PQT (mg/L); C_e é a concentração efluente de PQT em determinado período de tempo (mg/L) e V é o volume total do reator (L).

4.1.4 Montagem, operação e monitoramento dos reatores para os ensaios de biodegradação de paraquat e produção de celulase em bateladas aeradas com biomassa dispersa

Em vista dos trabalhos encontrados na literatura que estudaram a remoção de poluentes de águas contaminadas (KOPYTKO et al., 2002; TSAI; LAI; HSEIN, 2004; DA SILVA, 2015; MIOLA JUNIOR, 2015) como também a produção de enzimas a partir de diversos resíduos agroindustriais (MENEZES, 2006; DA CRUZ et al., 2015), na Etapa Idessa pesquisa foram montados reatores contendo pesticida PQT e casca de mandioca em diferentes concentrações para avaliar o potencial do fungo *Aspergillus niger* AN 400 em degradar o pesticida e sua capacidade em produzir a enzima celulase no mesmo reator.

Para avaliar a degradação do PQT por *Aspergillus niger* AN 400 e a produção de celulase a partir da casca de mandioca foram utilizados reatores previamente esterilizados.

2,5 L de volume útil (Figura 16) nas bateladas aeradas com biomassa dispersa cujas características estão apresentadas na Tabela 6.

Figura 16 - Reatores de vidro com volume útil de 2,5 L utilizados nos ensaios.



Fonte: Autor (2016).

Tabela 6 - Características dos ensaios realizados nessa etapa.

Concentração de Vishniac (mL/L)	Concentração de PQT(mg/L)	Tamanho do inóculo	Concentração de casca (g/L)	Concentração de glicose(g/L)	Tempos reacionais (h)
1,0	30,0	2×10^6 esporos/mL	0 – 3,0	0 - 0,5	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48, 72, 144 e 168

Fonte: Autor (2016).

Foram realizadas 4 bateladas distintas, dentre as quais 3 eram compostas por 2 reatores com fungo e 2 sem fungo e uma batelada composta por 1 reator com fungo e 1 sem fungo, totalizando 14 tipos de reatores variando a concentração da casca de mandioca e de glicose (Tabela 7).

Tabela 7 - Configuração das bateladas aeradas com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 variando a concentração da casca de mandioca e presença de glicose.

Batelada sem casca	Batelada 0,5 g/L de casca	Batelada 1,0 g/L de casca	Batelada 3,0 g/L de casca
RFP	RFPC	RFPC	RFPC
RP	RPC	RPC	RPC
	RFPCG	RFPCG	RFPCG
	RPCG	RPCG	RPCG

NOTA: RP – reator sem fungo, com PQT; RFP – reator com fungo e PQT; RFPC – reator com fungo, PQT e casca de mandioca; RPC – reator sem fungo com PQT e casca; RFPCG – reator com fungo, PQT, casca e glicose 0,5 g/L; RPCG – reator sem fungo com PQT, casca e glicose 0,5 g/L.

Fonte: Autor (2016).

A casca de mandioca e a água de torneira (2,5 L) com solução de Vishniac, cuja composição química contém (g/L): EDTA (10,0); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4,4); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,0); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32); $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,22); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,47); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0), foram autoclavados separadamente a 1,0 atm sob temperatura de 121°C por 20 minutos. Em seguida, misturou-se a casca, a água e adicionou-se o PQTsolúvel, comercializado como Gramoxone 200, aos reatores, os quais foram inoculados com tamanho de inóculo de 2×10^6 esporos/mL.

Para cada tempo reacional (TR) estudado foram coletadas alíquotas de 15 mL de cada reator para a realização das análises de pH, DQO filtrada ou solúvel, concentração de PQT, atividade de celulase total e sólidos suspensos voláteis (SSV). Com o intuito de não comprometer a integridade do processo, o volume da alíquota coletada a cada TR foi coerente com o volume útil restante no reator no último TR (168 h).

4.2 Etapa II: Produção de α -amilase a partir de substrato de mandioca

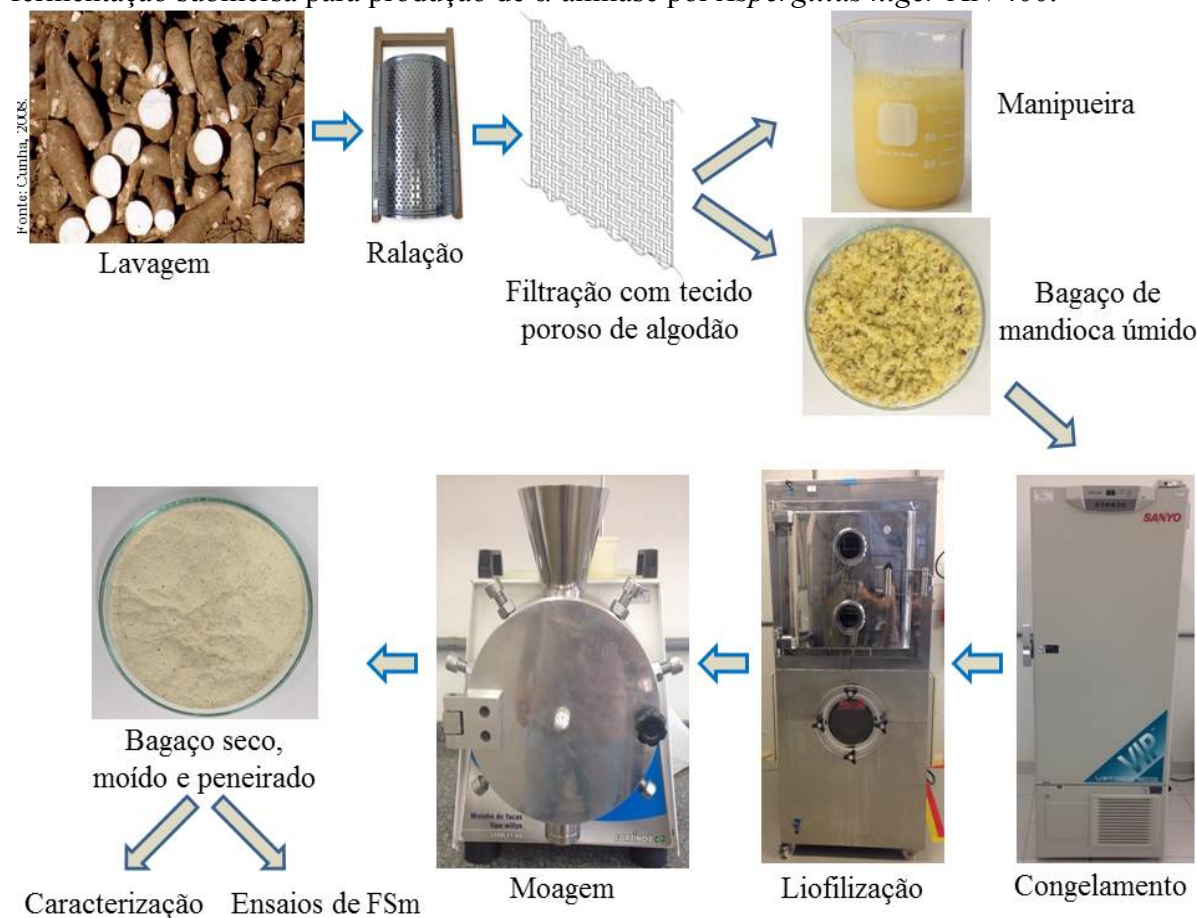
4.2.1 Preparação do substrato de mandioca

Nessa Etapa também utilizou-se a mandioca doada pelo CETREX colhida na safra de agosto de 2015. Inicialmente, a raiz amilácea foi lavada e fragmentada em ralador rudimentar feito de aço. Posteriormente, foi realizada a filtração da mandioca ralada para obtenção do substrato de mandioca, tendo-se utilizado um filtro de tecido de algodão poroso. Nessa fase, a partir de 8,4 kg de raízes de mandioca foram obtidos 3,5 L de manipueira e 4,9 kg de substrato úmido constituído por fibras, amido e umidade. Após a filtração, o substrato foi congelado em ultrafreezer (marca Sanyo) por 24 horas à -80°C para ser realizada a liofilização (Liotop LP 510) sob condições de temperatura de 30°C, pressão de 800 μHg por 30 horas. Nessa etapa, a massa de substrato seco foi de 1,62 kg. Em seguida, o substrato foi triturado e peneirado (malha granulométrica de 2 mm ou 10 mesh) em moinho de facas (Fortinox tipo Willye – Star FT 80), para promover a homogeneização das partículas e aumentar a área superficial do material (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000), e acondicionadas em local seco a temperatura ambiente.

Na Figura 17 é apresentado o fluxograma da preparação do substrato de mandioca para sua utilização nos ensaios de fermentação submersa. As etapas de lavagem, ralação, filtração e os ensaios de FSm foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE),

Fortaleza, Ceará. Já as etapas de congelamento, liofilização, moagem e caracterização foram realizadas no Laboratório de Tecnologia da Biomassa – LTB localizado na Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará.

Figura 17 - Fluxograma da preparação do substrato de mandioca utilizado nos ensaios de fermentação submersa para produção de α -amilase por *Aspergillus niger* AN 400.



Nota: FSm – fermentação submersa.

Fonte: Autor (2016).

O substrato seco e moído foi caracterizado segundo as normas TAPPI T421 om-02 (2002b), T211 om-02 (2002a), T204 cm-97 (1997), T 222 om-02 (2002b), T203 cm-99 (2009) para a determinação de umidade, cinzas, extrativos, lignina e alfa-celulose, respectivamente. Os teores de holocelulose e hemicelulose foram determinados segundo Yokoyama et al. (2002). O amido foi extraído segundo AOAC (1992) e determinado pelo método do DNS descrito por Miller (1959). As cinzas do substrato de mandioca foram caracterizadas por Espectrofotometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) quanto aos seguintes elementos químicos constituintes: alumínio, cádmio, ferro, cobre,

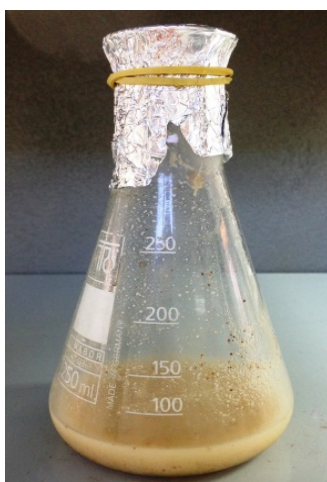
chumbo, magnésio, manganês, níquel, sódio, cálcio, cobalto, bário, zinco, cromo e titânio. Todas essas análises foram realizadas em duplicata.

4.2.2 Montagem dos ensaios de fermentação submersa para a produção de α -amilase

O cultivo, preparação da suspensão de esporos e contagem de esporos foram realizados conforme citado anteriormente na Etapa I utilizando o mesmo fungo.

Para avaliar o potencial de produção fúngica de α -amilase a partir de substrato de mandioca foi realizada uma batelada de fermentação submersa utilizando frascos Erlenmeyers de 250 mL (Figura 18) contendo 2,5 g (50 g/L) de substrato de mandioca (GANGADHARAN et al., 2008), tamanho de inóculo de 2×10^6 esporos/mL (SILVA et al., 2005) e meio nutricional (RODRIGUES, 2006) (Tabela 8).

Figura 18 - FSm em frasco Erlenmeyer de 250 mL após autoclavagem do substrato de mandioca e do meio.



Fonte: Autor (2016).

Tabela 8 - Composição do meio nutricional.

Reagentes	Concentração (g/L)
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ – Sulfato de amônio	2,00
NaNO_3 - Nitrato de sódio	1,00
KH_2PO_4 – Fosfato de potássio monobásico	0,20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de magnésio heptahidratado	0,25
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de cálcio dihidratado	0,01
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de cobre heptahidratado	0,08
H_2MoO_4 – Ácido molibídico	0,05
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de manganês heptahidratado	0,05
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ – Sulfato férrico	0,05
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de zinco monohidratado	0,04

Fonte: Adaptado de Rodrigues (2006).

Todos os testes foram conduzidos em incubadora de bancada (Cientec CT-712) (Figura 19) sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C e os períodos de fermentação foram de 0, 24, 48, 72, 96 e 168 horas.

Figura 19 - Incubadora de bancada utilizada nos ensaios de fermentação submersa.



Fonte: Autor (2016).

Para cada período fermentativo estudado foi utilizado 1 Erlenmeyer com características idênticas aos demais, totalizando 6 para cada batelada, com o intuito de não comprometer a integridade do processo.

O substrato de mandioca e o meio nutricional foram autoclavados separadamente a 1,0 atm sob temperatura de 121°C por 15 minutos. Todos os Erlenmeyers utilizados nesses ensaios também foram autoclavados nas mesmas condições anteriores. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,0 com NaOH 2 M antes da autoclavagem. Em seguida, misturou-se o substrato e o meio autoclavados aos Erlenmeyers, os quais foram inoculados com tamanho de inóculo 2×10^6 esporos/mL. Após cada período de fermentação, o referente Erlenmeyer foi retirado da incubadora para a realização das análises de pH e atividade dextrinizante de α -amilase.

4.3 Métodos analíticos

As análises de pH, DQO e SSV foram realizadas conforme descrito por APHA (2005). A concentração de PQT foi determinada pelo método descrito na Norma AOAC

Official Method 969,09 Paraquat in Pesticide Formulations de 2000, configurada por meio da reação entre o ditonito de sódio 1%, preparado em solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L e o PQT contido na amostra. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Thermo Scientific (marca Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer) em comprimento de onda de 600 nm. Com base nos resultados de remoção do pesticida, realizou-se a modelagem cinética para o processo de biodegradação segundo o modelo clássico de primeira ordem descrito pela Equação 3 (VON SPERLING, 2005).

$$\ln \frac{C}{C_0} = -k \cdot t \quad (3)$$

Onde: C é a concentração do PQT em determinado tempo reacional (mg/L); C_0 é a concentração inicial do PQT (mg/L); k é a constante de velocidade de primeira ordem e t é o tempo reacional (horas).

O processo de extração das enzimas das Etapas I e II foi realizado por filtração a vácuo em filtro Milipore com membrana de fibra de vidro 47 mm de diâmetro (marca AXIVA). As alíquotas filtradas foram utilizadas na determinação das enzimas e conservadas a 4°C.

A determinação da atividade dextrinizante da α -amilase foi feita medindo-se a diminuição da capacidade de ligação do amido ao iodo de uma solução tratada com uma solução enzimática bruta seguindo o procedimento descrito por Fuwa (1954), com modificações. Experimentalmente foram adicionados em tubos de ensaio 0,7 mL de solução de amido solúvel 0,3% em tampão acetato 0,25 M (pH= 5,0) e 0,3 mL de extrato enzimático. Após incubação a 60°C por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4 mL de HCl 0,2 M e 0,5 mL de reativo de iodo (KI 0,3% + 0,03% I_2). Após homogeneização, a mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada, novamente homogeneizada e lida em espectrofotômetro a 600 nm. A absorbância do amido ou da reação foi estimada conforme descrito anteriormente substituindo a enzima por água destilada. Para a absorbância da enzima substituiu-se o amido por tampão acetato, considerando a possibilidade de presença de resíduos de amido no extrato enzimático. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 minutos nas condições experimentais, conforme a Equação 4.

$U/mL = \frac{Abs_{AM} - C}{Abs_{AM}} \times \frac{Q_s}{10} \times \frac{F_d}{V_e}$ (4) Onde: U/mL é a unidade de enzima (mg/min x mL), C é a absorbância do substrato amido (a soma da absorbância do amido e da enzima), Abs_{AM} é a

absorbância da amostra, Q_s é a quantidade de substrato (amido) utilizada na reação em mg, 10 é o tempo de referência da hidrólise do amido (10 min), Fd é o fator de diluição e Ve é o volume de extrato enzimático utilizado na reação.

A determinação da atividade de celulase total foi realizada de acordo com o método descrito por Miller (1959), reportado por Ghose (1987), o qual se baseia na medição da dosagem de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman nº 1 com dimensões de 1 cm x 6 cm (aproximadamente 50 mg), a partir das enzimas presentes no extrato enzimático. Em tubos de ensaio com 25 mL de volume útil foram adicionados 1mL de solução tampão citrato de sódio (pH 4,8 e 0,05 M), 0,5 mL de extrato enzimático (amostra filtrada) e uma tira de papel de filtro. Para o branco total (zera o espectro), o extrato enzimático foi substituído por 0,5 mL de tampão citrato de sódio. Para o branco da enzima, adicionou-se 1 mL do mesmo tampão e 0,5 mL de extrato sem a presença da tira de papel filtro. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa microbiológica a 50°C por 60 minutos. Após a incubação, adicionou-se 3 mL de ácido DNS (3,5-dinitrossalicílico) em cada tubo e leva-os ao banho-maria (marca QUIMIS) a 100°C por 5 minutos. Após a interrupção da reação com um banho de água fria, adicionou-se 20 mL de água destilada e homogeneizou-os. Após 20 minutos, a leitura se deu em espectrofotômetro Thermo Scientific (marca Evolution 60S UV - Visible Spectrophotometer) em comprimento de onda de 540 nm.

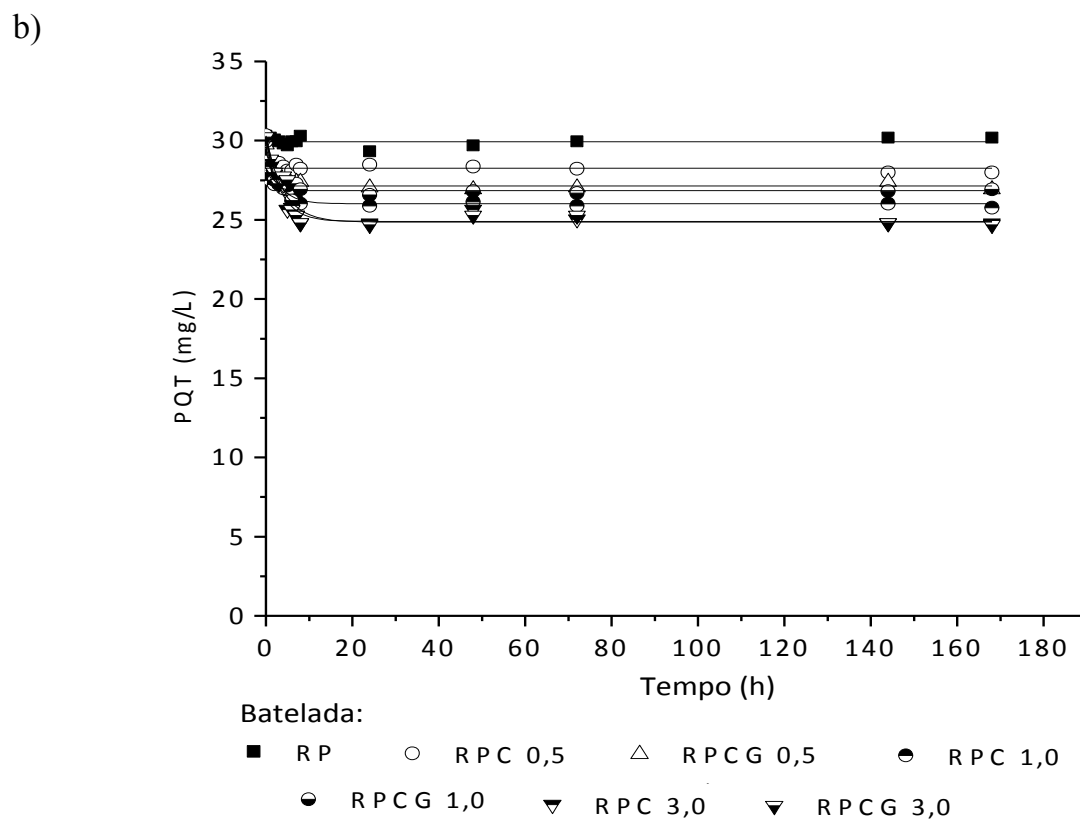
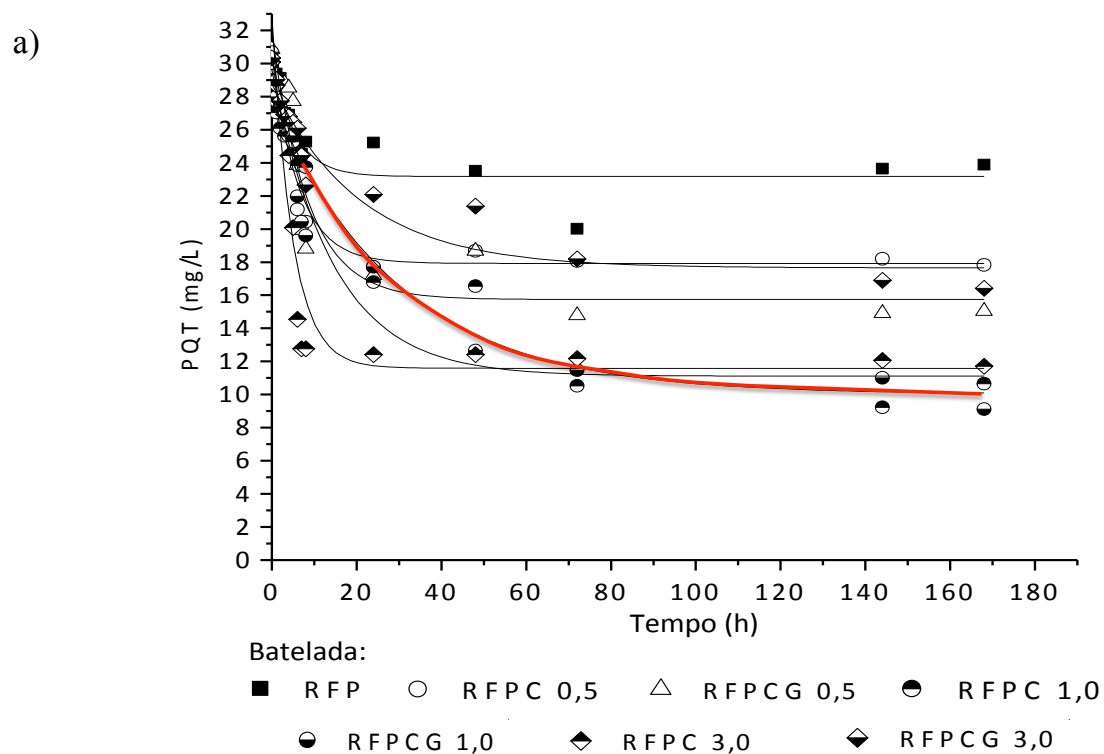
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico estão apresentados os resultados e discussões das Etapas I e II realizadas nessa pesquisa em reatores em bateladas aeradas com biomassa fúngica dispersa para avaliar a biodegradação de PQT e a produção de celulase a partir de diferentes concentrações de casca de mandioca e os testes de fermentação submersa para a produção de α -amilase a partir de substrato de mandioca.

5.1 Etapa I: Biodegradação fúngica de paraquat e produção de celulase a partir da casca de mandioca

A cinética de decaimento do PQT seguiu uma cinética de primeira ordem (Figura 20), e os percentuais de remoção de PQT nos reatores com as concentrações de 0,5; 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca sem glicose e com glicose, no período de 168 horas, estão apresentados na Figura 21. A máxima eficiência registrada foi de 70,3% (Figura 21) para o reator com fungo e glicose RFPCG 1,0, após 7 dias de operação. Pode-se observar que as eficiências de remoção de PQT aumentaram gradativamente a medida que se aumentou a concentração de casca de mandioca e com a presença da glicose. De acordo com os autores Sumathi e Manju (2000), Sampaio (2005) e Quingxiang (2008), a presença de um cossubstrato no meio reacional pode refletir em uma maior eficiência de remoção de poluentes persistentes, como o PQT, uma vez que a glicose não funciona apenas como cossubstrato necessário para o crescimento celular, mas também para a produção de enzimas responsáveis por facilitar a assimilação do poluente pelo micro-organismo.

Figura 20 – Cinética de decaimento do PQT ajustada em um modelo de primeira ordem nos reatores com fungo (a) e sem fungo (b).

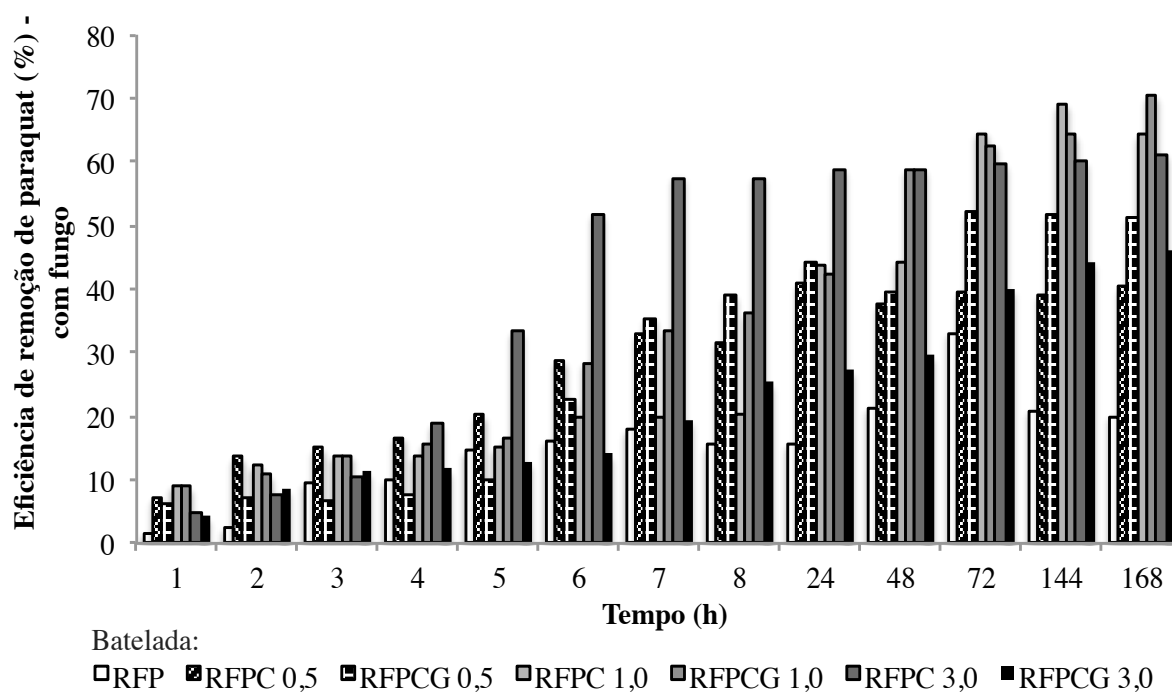


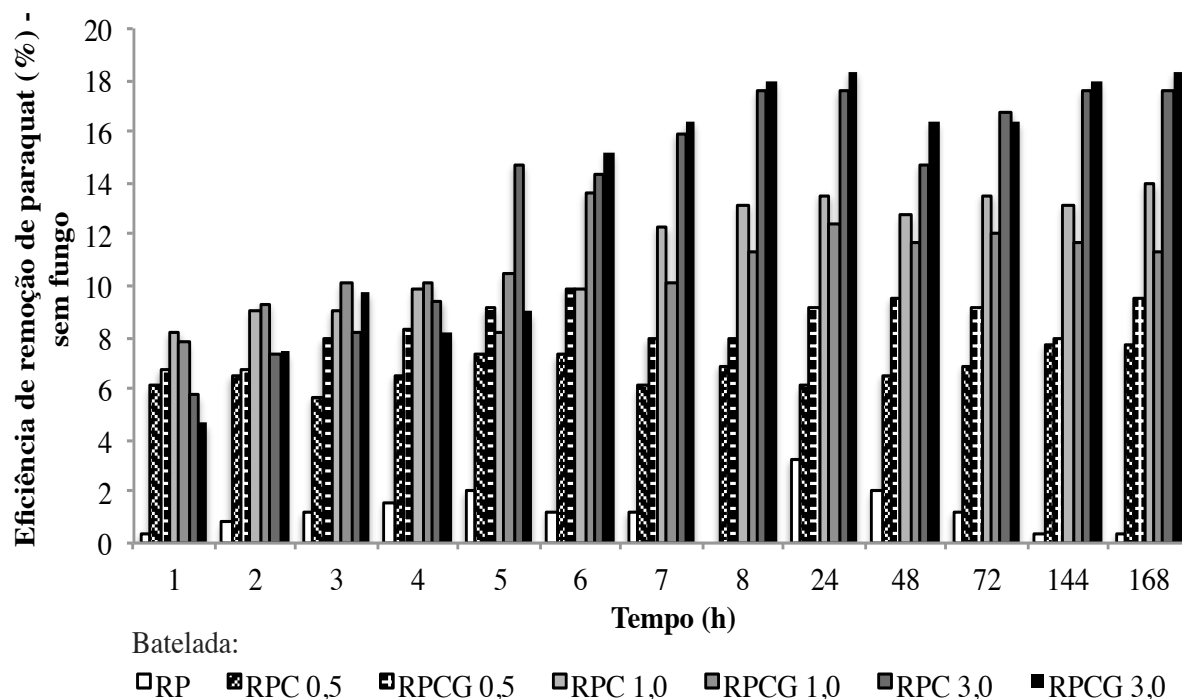
Reatores	k (h ⁻¹)	R ²
RFP	0,1854	0,7809
RFPC 0,5	0,1567	0,9038
RFPC 1,0	0,0333	0,9664
RFPC 3,0	0,2051	0,8753
RFPCG 0,5	0,1172	0,8758
RFPCG 1,0	0,0694	0,9488
RFPCG 3,0	0,0479	0,9050

NOTA: RP - reator sem fungo, com PQT; RFP - reator com fungo e PQT; RFPC - reator com fungo, PQT e casca de mandioca; RPC - reator sem fungo, com PQT e casca de mandioca; RFPCG – reator com fungo, PQT, casca de mandioca e glicose.

Fonte: Autor (2016).

Figura 21 – Eficiências de remoção de PQT nos reatores com fungo e sem fungo com concentrações de 0, 0,5, 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca e 30 mg/L de PQT em 168 horas de operação.





NOTA: RFP – reator com fungo e PQT; RFPC - reator com fungo, PQT e casca de mandioca; RFPCG – reator com fungo, PQT, casca de mandioca e 0,5 g/L de glicose; RP – reator sem fungo, apenas com PQT; RPC - reator sem fungo, com PQT e casca de mandioca; RPCG – reator sem fungo, com PQT e casca de mandioca adicionado de 0,5 g/L de glicose.

Fonte:

Autor (2016).

Kopytko et al. (2002) estudou a degradação de PQT em bateladas com biomassa de bactérias *Pseudomonas putida* imobilizada em gel de alginato de cálcio e encontraram a variação de 48 a 95% de degradação do pesticida após a adição de carvão ativado e glicose 1 g/L no reator, mostrando que a presença de glicose promove maior eficiência, assim como encontrado na presente pesquisa.

Nos experimentos de Kodama et al. (2011), o reator com glicose foi o que apresentou maior eficiência de remoção do pesticida simazine, mas a eficiência desse reator (53%) foi inferior a encontrada na presente pesquisa (70,31%). Da Silva (2015) reportou eficiência máxima em reatores com glicose 44% de remoção máxima de PQT no reator com glicose 0,5 g/L, no 30º dia de operação, utilizando reatores em bateladas aeradas com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400, porém esse percentual também foi inferior ao dessa pesquisa.

Contudo, conforme observado na Figura 21, o reator com fungo sem glicose RFPC 1,0 apresentou eficiência máxima de 69% em 144 horas, valor bastante próximo do reator com as mesmas condições contendo glicose. Desse modo, pode-se afirmar que, ao final

da operação, a presença do cossubstrato no reator RFPCG 1,0 não foi determinante para atingir uma máxima eficiência de degradação do poluente (70,3%), o que torna o sistema RFPC 1,0 mais viável economicamente. E quanto à influência da concentração de casca de mandioca na biodegradação de PQT, a eficiência do processo foi maior à medida que se aumentou a concentração de casca e adicionou-se glicose. Porém, os reatores com 3,0 g/L de resíduo com e sem glicose apresentaram eficiências menores, quando comparados com os reatores de 1,0 g/L de casca (mais eficientes), e permaneceram constantes a partir de 72 horas, apesar de terem atingido mais rápido 50% de eficiência em apenas 6 horas. Isso ocorreu, provavelmente, devido à saturação do sistema em vista da maior quantidade de matéria orgânica disponível, fato observado também por Royer (2008).

Hai et al. (2012) conseguiram elevadas eficiências de remoção dos pesticidas, aldicarbe, atrazina e alacloro em reatores com cultura fúngica sem adição de glicose após 7 dias de operação, cujas eficiências foram 79, 81 e 59%, respectivamente. Os autores afirmaram que as altas remoções de pesticidas foram alcançadas devido a biodegradação ter ocorrido juntamente com o processo biossorção dos pesticidas, porém, após o período de 14 dias, a concentração dos poluentes aumentou, associando a possível dessorção dos compostos para a fase líquida. Na presente pesquisa foram registrados percentuais próximos aos de Hai et al. (2012), porém, como o tempo de operação daquela pesquisa foi menor (7 dias), o processo de dessorção pode ter sido evitado.

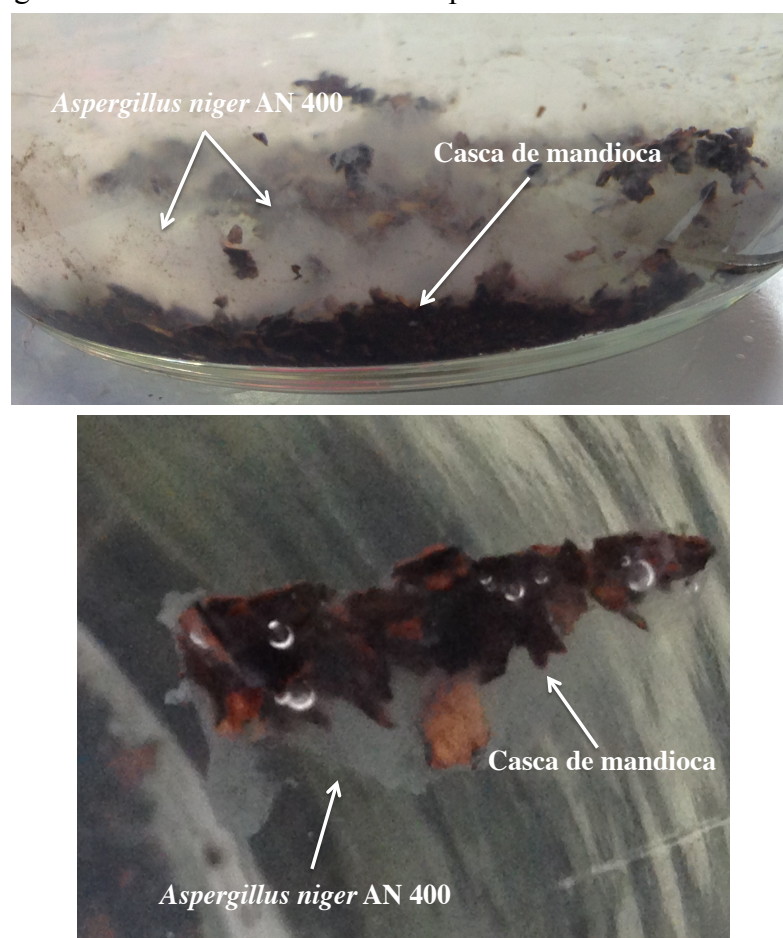
Tastan e Donmez (2015) investigaram a biodegradação do pesticida triclosan por *Aspergillus versicolor* e registraram 61,92% de remoção máxima do poluente no 5º dia de experimento com concentração inicial de 7,5 mg/L de pesticida, enquanto que na presente pesquisa foi alcançado 64,61% com concentração inicial de 30 mg/L de PQT após apenas 3 dias de operação, o que evidencia que o *Aspergillus niger* AN 400 se apresentou mais eficiente.

No presente trabalho, ensaios de adsorção de PQT na casca de mandioca em concentrações de 0,5, 1,0 e 3,0 g/L foram desenvolvidos e encontrou-se as seguintes massas de pesticida adsorvido por grama de casca de mandioca: 0,0064 g/g (10,6%), 0,0066 g/g (22%), 0,0036 g/g (33%), respectivamente. Como o reator RFPCG 1,0 removeu 70,3% de PQT, isso significa que apenas 22% da massa total de PQT presente no reator foi adsorvida na casca de mandioca e o restante (48,3%), resultou da degradação biológica dos fungos. Como a biomassa lignocelulósica utilizada nesse trabalho é constituída basicamente por lignina,

celulose e hemicelulose, as quais apresentam hidroxilas, carboxilas e grupos fenólicos capazes de interagir com íons presentes no poluente e permitir a retenção de contaminantes na superfície da biomassa (DOULATI et al., 2008; WANG et al., 2013), a casca de mandioca atuou como um eficiente adsorvente natural na remoção de compostos persistentes. Esse fato representa uma alternativa econômica e ambiental para a descontaminação de águas residuárias contaminadas com pesticidas, uma vez que o material utilizado é de baixo custo e de grande disponibilidade.

O reator com fungo sem casca (RFP) apresentou 33% de eficiência máxima de remoção de PQT, conforme apresentado anteriormente na Figura 21, e todos os reatores com fungo que continham casca alcançaram eficiências maiores, mostrando que nos últimos, o resíduo atuou como um bom adsorvente como também serviu, principalmente, de material suporte para o crescimento fúngico, como observado na Figura 22.

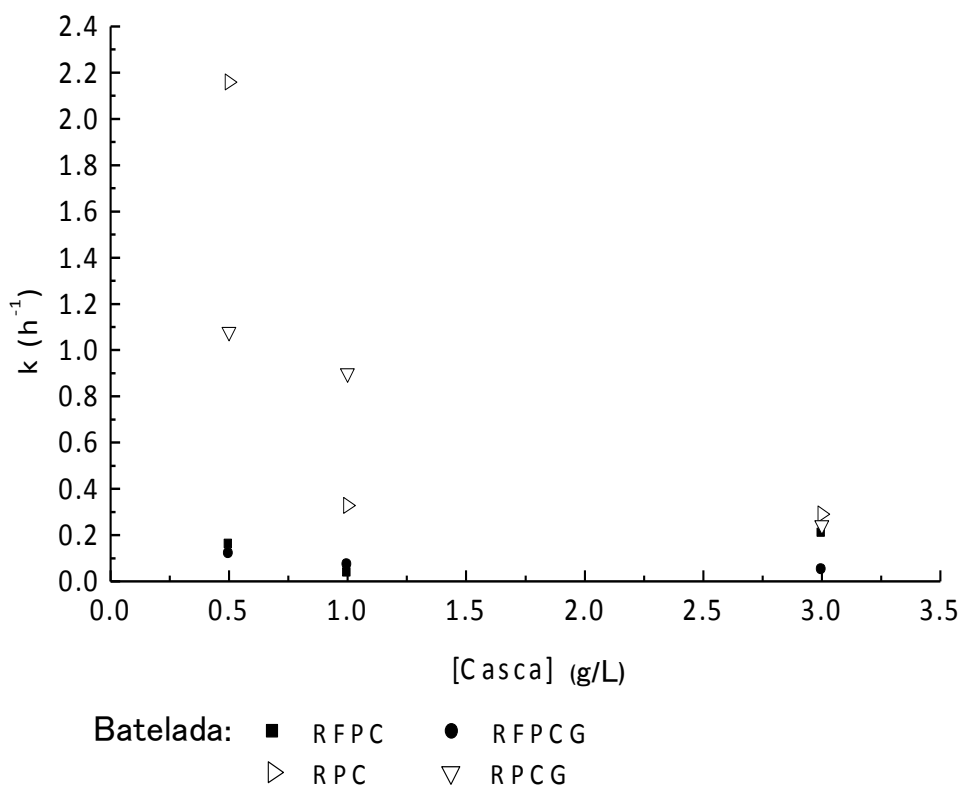
Figura 22 – Crescimento de *Aspergillus niger* AN 400 sobre a casca de mandioca nos reatores com fungo no decorrer de 168 horas de experimento.



Fonte: Autor (2016).

Na Figura 23 estão apresentadas as constantes de velocidade de decaimento do PQT em diferentes concentrações de casca de mandioca, seguindo um modelo de primeira ordem. A maior velocidade de remoção de PQT ($2,19 \text{ h}^{-1}$) ocorreu no reator sem fungo RPC 0,5, evidenciando a predominância de adsorção a qual se caracteriza por ser um processo mais rápido que o de degradação. Pode-se inferir, também, que a maior velocidade neste reator deveu-se também à saturação da casca de mandioca que se dá mais rapidamente quando há menor quantidade de casca. Nos reatores com fungo, a maior velocidade ($0,21 \text{ h}^{-1}$) foi registrada no reator RFPC 3,0, provavelmente devido ao processo de adsorção inicial seguido de degradação com remoção de PQT de 60%, após 168 horas. Porém, vale ressaltar que o reator de maior eficiência (RFPCG 1,0; 70,3%), no caso com fungo, não foi o de maior velocidade. Tal condição permite inferir que a utilização conjunta do adsorvente (no caso a casca de mandioca) com biomassa fúngica proporcionou melhor resposta ao longo das 168 horas.

Figura 23 – Constantes de velocidade de decaimento do PQT nas concentrações de 0,5, 1,0, 3,0 g/L de casca de mandioca, seguindo um modelo de primeira ordem.

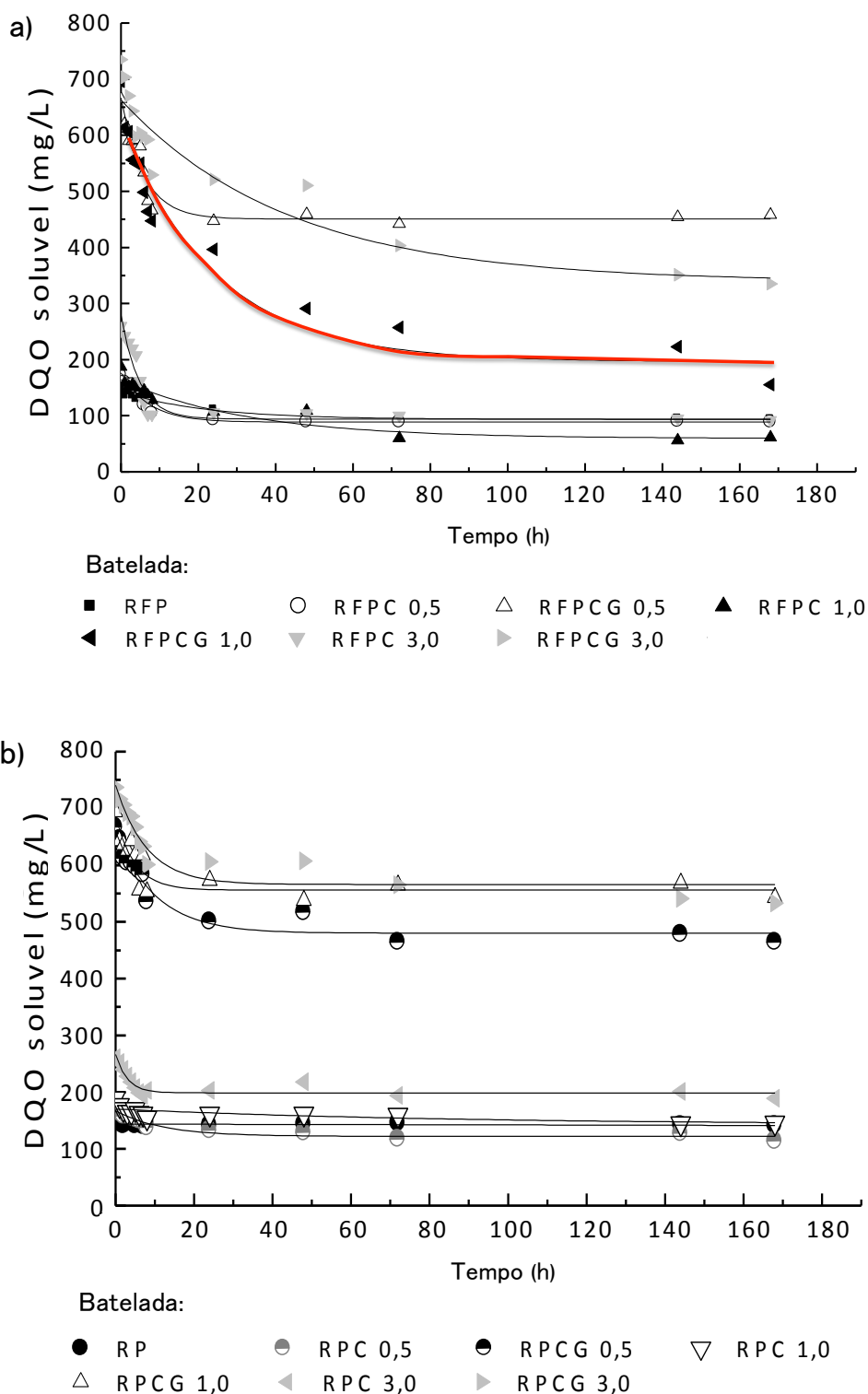


NOTA: RFPC - reator com fungo, PQT e casca de mandioca; RFPCG – reator com fungo, PQT, casca de mandioca e 0,5 g/L de glicose; RPC - reator sem fungo, com PQT e casca de mandioca; RPCG – reator sem fungo, com 30 mg/L de PQT adicionado de 0,5 g/L de glicose.
Fonte: Autor (2016).

Nas Figuras 24 e 25 estão apresentadas a cinética de decaimento de matéria orgânica carbonácea ajustada em um modelo de primeira ordem e os percentuais de remoção de matéria orgânica em termos de DQO solúvel, respectivamente. Ao se comparar as máximas eficiências de remoção de DQO dos reatores com fungo de cada concentração de casca de mandioca sem glicose com os de mesmas condições com glicose, observa-se que as melhores eficiências ocorreram nos reatores com fungo e glicose, sendo registrada a eficiência máxima de 78% no reator RFPCG 1,0 após 168 horas de experimento. Conforme relatado por El-Rahim et al. (2009), as melhores eficiências registradas nos ensaios com glicose podem ser explicadas pela disponibilidade de substrato de fácil assimilação pelos fungos em meio a moléculas de estruturas complexas, o que de acordo com Singh (2006), a glicose ao ser utilizada como co-substrato gera subprodutos muito mais reativos que o pesticida, os quais reagem com o poluente gerando compostos passíveis de serem metabolizados, ao longo do tempo, pelas enzimas produzidas pelo micro-organismo.

Ainda analisando as Figuras 24 e 25, observa-se que nas primeiras 6 horas de experimento, o reator RFPC 3,0 se destacou dos demais e alcançou cerca de 52,3% de eficiência, enquanto que os outros apresentaram uma eficiência em torno de 28,4%. O mesmo reator, porém com adição de glicose (RFPCG 3,0), obteve menor eficiência (18,7%) nesse mesmo período.

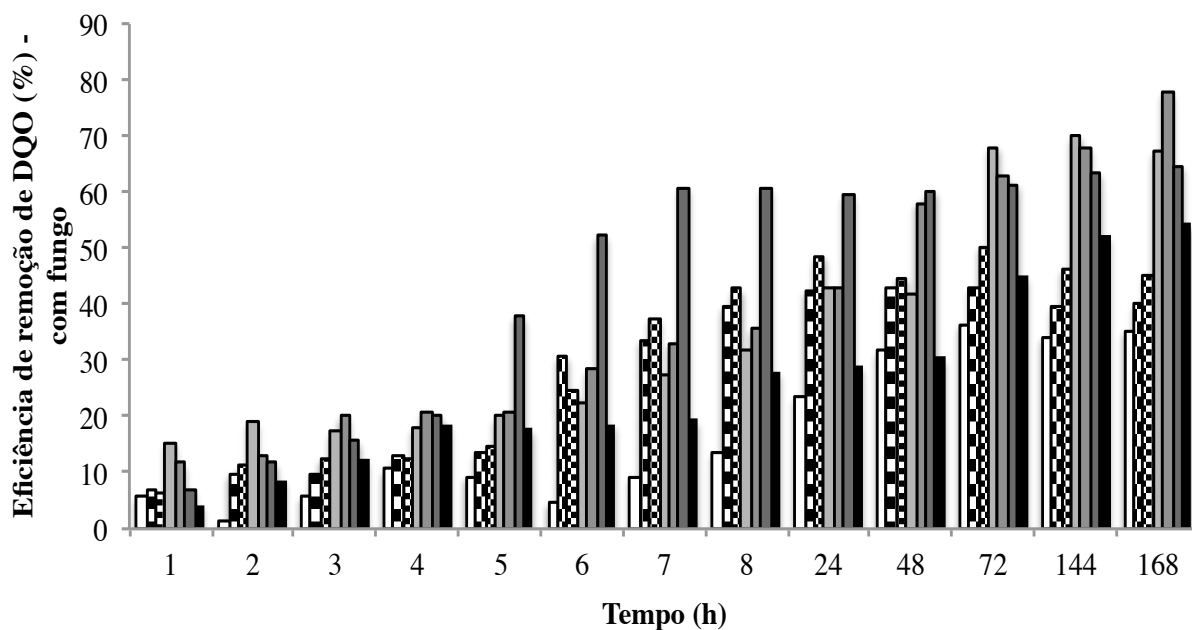
Figura 24 – Cinética da variação de DQO solúvel nos reatores com fungo (a) e sem fungo (b) com concentrações de 0,5, 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca e 30 mg/L de PQT em 168 horas de operação.



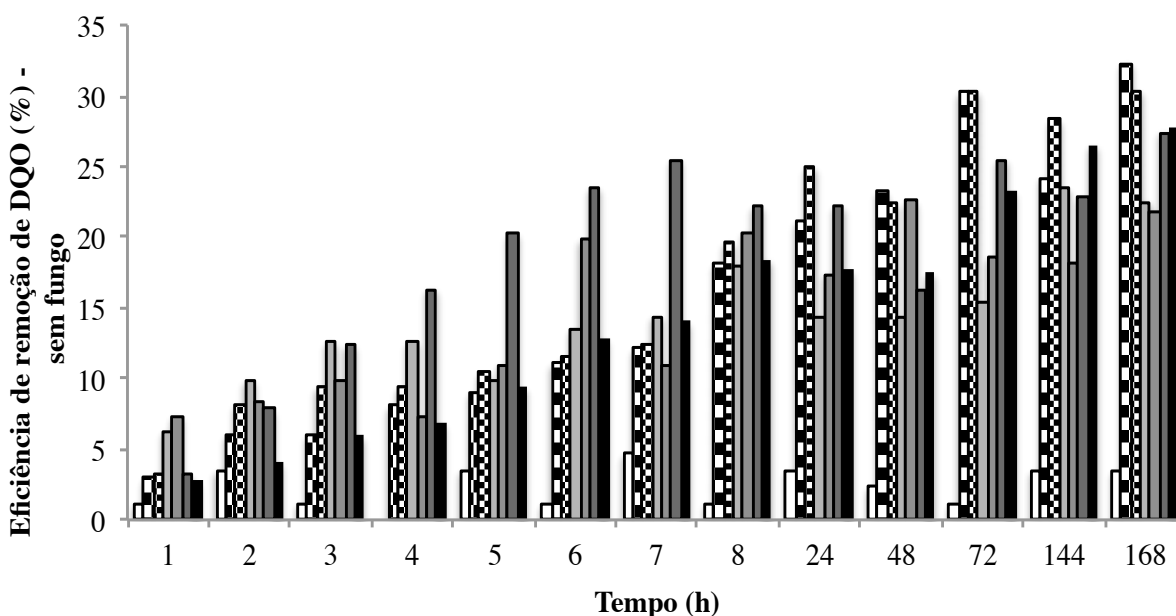
NOTA: RFP – reator com fungo e PQT; RFPC - reator com fungo, PQT e casca de mandioca; RFPCG – reator com fungo, PQT, casca de mandioca e 0,5 g/L de glicose; RP – reator sem fungo, apenas com PQT; RPC - reator sem fungo, com PQT e casca de mandioca; RPCG – reator sem fungo, com PQT e casca de mandioca adicionado de 0,5 g/L de glicose.

Fonte: Autor (2016).

Figura 25 – Eficiências da remoção de DQO solúvel nos reatores com fungo (a) e sem fungo (b) com concentrações de 0,5; 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca e 30 mg/L de PQT em 168 horas de operação.



Batelada:
 □RFP □RFPC 0,5 ▨RFPCG 0,5 ▤RFPC 1,0 ▥RFPCG 1,0 ▧RFPC 3,0 ▩RFPCG 3,0



Batelada:
 □RP □RPC 0,5 ▨RPCG 0,5 ▤RPC 1,0 ▥RPCG 1,0 ▧RPC 3,0 ▩RPCG 3,0

NOTA: RFP – reator com fungo e PQT; RFPC - reator com fungo, PQT e casca de mandioca; RFPCG – reator com fungo, PQT, casca de mandioca e 0,5 g/L de glicose; RP – reator sem fungo, apenas com PQT; RPC - reator sem fungo, com PQT e casca de mandioca; RPCG – reator sem fungo, com PQT e casca de mandioca adicionado de 0,5 g/L de glicose.

Autor (2016).

Fonte:

Essa baixa eficiência de remoção de DQO no reator RFPCG 3,0 (18,7%) nas 6 primeiras horas ocorreu, possivelmente, devido a não metabolização do pesticida nesse período, uma vez que o fungo teria utilizado a glicose como fonte primária de carbono, conforme mostrado na Figura 22, o que também foi observado por Da Silva (2015). Os autores Ali et al. (2008) e Ikeda et al. (2006) explicam que os reatores com glicose, em curtos períodos de tempo, podem apresentar baixa eficiência de DQO devido ao processo de degradação do cossubstrato resultar na síntese de subprodutos que são contabilizados nos valores de DQO antes de reagirem com o poluente. Entretanto, a concentração ótima de glicose a ser empregada depende de alguns fatores, como a espécie fúngica inoculada, a estrutura molecular do poluente, o regime de operação do reator, entre outros (SINGH, 2006).

A Tabela 9 mostra as variações das concentrações de sólidos suspensos voláteis avaliados no início (0 horas) e no final da operação (168 horas). Ao analisar essa tabela, pode-se observar que a diferença dos valores de SSV nos reatores sem fungo é insignificante, tendendo a zero, mostrando que não houve crescimento fúngico no meio. A eficiência máxima de SSV encontrada foi no reator com fungo RFPCG 3,0 com 37,81%, seguido do reator RFPCG 1,0 com 28,11%, ambos com a presença de glicose, carboidrato de fácil assimilação e fundamental para o desenvolvimento dos micro-organismos.

Tabela 9 – Variações de concentrações de sólidos suspensos voláteis (SSV) nas bateladas de diferentes concentrações de casca de mandioca inoculadas com *Aspergillus niger* AN 400.

Com fungo							
Bateladas	RFP	RFPC 0,5 g/L	RFPCG 0,5 g/L	RFPC 1,0 g/L	RFPCG 1,0 g/L	RFPC 3,0 g/L	RFPCG 3,0 g/L
C ₀ (mg SSV/L)	2,00	432,30	443,20	894,50	918,10	2593,00	2596,99
C (mg SSV/L)	2,07	459,96	479,66	1045,29	1176,00	3287,33	3379,00
Crescimento celular	3,40%	6,40%	8,23%	16,86%	28,11%	26,78%	37,81%
Sem fungo							
Bateladas	RP	RPC 0,5 g/L	RPCG 0,5 g/L	RPC 1,0 g/L	RPCG 1,0 g/L	RPC 3,0 g/L	RPCG 3,0 g/L
C ₀ (mg SSV/L)	1,99	432,30	440,23	1031,50	919,42	2513,50	2592,56
C (mg SSV/L)	2,00	459,50	440,89	1031,64	919,55	2515,02	2593,02
Crescimento celular	0,00%	0,05%	0,15%	0,01%	0,01%	0,06%	0,02%

NOTA: C₀ - concentração inicial de SSV; C - concentração final de SSV; RFP - reator com fungo e PQT; RFPC - reator com fungo, PQT e casca de mandioca; RFPCG – reator com fungo, 30 mg/L de PQT, casca de mandioca e glicose 0,5 g/L; RP – reator apenas com PQT; RPC – reator sem fungo, com PQT e casca; RPCG – reator sem fungo, com PQT, casca e 0,5 g/L de glicose.

Fonte: Autor (2016).

Ao analisar a Figura 26 é possível afirmar visualmente que no RFPCG 1,0 o meio encontra-se mais clarificado comparado ao RFPCG 3,0, o que é bastante coerente, pois naquele reator se registrou a maior eficiência de remoção de pesticida e matéria orgânica solúvel. Os autores Kyriacou et al. (2005) afirmaram que o aumento da concentração de SSV está relacionado com a disponibilidade de matéria orgânica e nutrientes essenciais ao desenvolvimento dos fungos, resultando em um melhor polimento da água residuária, como visualizado nessa pesquisa.

Figura 26 – Crescimento de *Aspergillus niger* AN 400 nos reatores, após 168 horas, com concentração de 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca adicionados de 0,5 g/L de glicose, inoculados com 2×10^6 esporos/mL, 30 mg/L de PQT e 1 mL/L de Vishniac.



Fonte: Autor (2016).

No reator RFPCG 3,0 observou-se um meio escuro, turvo e espesso com grande crescimento fúngico. A grande disponibilidade de matéria orgânica decorrente da alta concentração de casca de mandioca, presença de glicose e de PQT possivelmente ocasionou uma limitação difusional de nutrientes no meio, o que refletiu em menores percentuais de remoção de pesticida e DQO, fato também observado por Andrade (2013).

Os valores de pH registrados nos reatores estudados nessa pesquisa estão apresentados nas Figuras 27 (reatores com fungo) e Figura 28 (reatores sem fungo).