



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM GESTÃO AMBIENTAL**

**DAVID ALVES DE SOUZA FILHO**

**REDUÇÃO DO POTENCIAL POLUIDOR DA MANIPUEIRA E PRODUÇÃO DE**  
**ÁCIDO CÍTRICO EM REATORES INOCULADOS COM FUNGO**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2016**

**DAVID ALVES DE SOUZA FILHO**

**REDUÇÃO DO POTENCIAL POLUIDOR DA MANIPUEIRA E PRODUÇÃO DE  
ÁCIDO CÍTRICO EM REATORES INOCULADOS COM FUNGO**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Marinho  
Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Kelly de Araújo  
Rodrigues Pessoa

**FORTALEZA**

**2016**

*Catálogo na fonte: Biblioteca Waldyr Diogo de Siqueira*

S719r      Souza Filho, David Alves de .  
Redução de pontencial da manipueira e produção de de ácido  
cítrico em reatores inoculados com fungo / David Alves de Souza Filho. -  
Fortaleza: IFCE, 2016.  
94 f.

Dissertação ( Tecnologia em Gestão Ambiental ).  
Orientadora: Dra. Glória Maria Marinho Silva

1. REATORES   2. ÁCIDO CÍTRICO.   3. REATOR . Título.

CDD 660.6

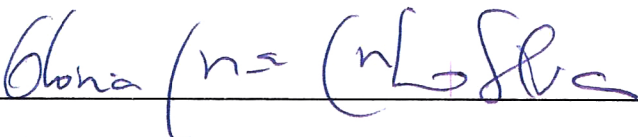
**DAVID ALVES DE SOUZA FILHO**

**REDUÇÃO DO POTENCIAL POLUIDOR DA MANIPUEIRA E PRODUÇÃO DE  
ÁCIDO CÍTRICO EM REATORES INOCULADOS COM FUNGO**

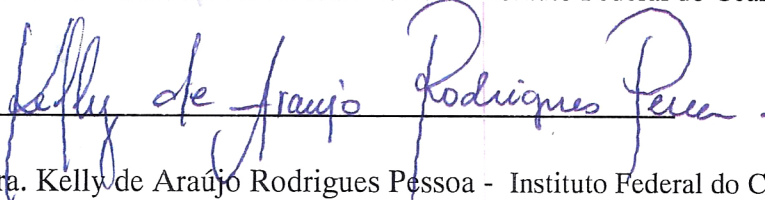
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal do Ceará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Aprovada em 08/06/2016

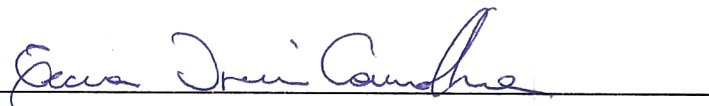
**BANCA EXAMINADORA**



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



Membro Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa - Instituto Federal do Ceará



Membro Profa. Dra. Técia Vieira Carvalho - Parque de Desenv. Tecnológico - PADETEC

### ***À minha família***

*À minha mãe Alice Morais Pessoa Alves, por toda dedicação em todos esses anos, ao meu pai David Alves de Souza (In Memoriam), por ter acreditado em mim, à minha tia Maria Luiza Alves de Souza, por ser uma segunda mãe e à minha irmã, pela sua amizade.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Alice Morais e David Alves (*in memoriam*), pelo exemplo de amor, esperança, gratidão, simplicidade, honestidade, dedicação, zelo e apoio incondicional, aos quais serei eternamente gratos e à minha irmã, pela amizade e companheirismo.

À minha orientadora Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva, pela confiança e dedicação a esse projeto.

À minha co-orientadora professora Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa, pelo apoio na realização desse trabalho, incentivo, e dedicação.

Aos bolsistas do LATAM em especial à Alyne e Nathalia pela inestimável colaboração.

A todos os professores do Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental, por todo o conhecimento compartilhado.

À minha turma, por ter tornado essa caminhada mais divertida, em especial ao Joab e à Gleycielle, pelos momentos de apoio e incentivo.

A todos os amigos, em especial ao Marcelo, por toda ajuda e se manter presente durante essa jornada.

Ao Governo do Estado do Ceará pela liberação como incentivo à formação profissional.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.”

(William Shakespeare)

## RESUMO

A manipueira, resíduo gerado do processamento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), geralmente, é descartada de forma irregular no meio ambiente, tornando-se um problema ambiental grave, à medida que polui rios e solos, com carga orgânica alta e à presença de cianeto. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade remoção de matéria orgânica e de cianeto pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* AN 400 em reatores aeróbios a partir do uso da manipueira como substrato, operados em bateladas e também a viabilidade de produção de ácido cítrico. O experimento compreendeu três etapas: etapa I - teste de toxicidade; etapa II - operação com reatores e biomassa dispersa com diferentes condições nutricionais sob agitação de 120 rpm, em mesa agitadora orbital; e etapa III - operação em reator aeróbio contendo biomassa fúngica imobilizada em cubos de espuma de poliuretano, com as melhores condições observadas na etapa II. As análises propostas para monitoramento da eficiência do processo foram a demanda química de oxigênio, potencial hidrogeniônico, ácido cítrico e cianeto. A manipueira utilizada neste trabalho apresentou alta concentração de demanda química de oxigênio ( $65.000 \text{ mg.L}^{-1}$ ), o que revelou seu alto poder poluidor, e ainda, concentração de cianeto de ( $7,75 \text{ mg.L}^{-1}$ ), que está acima do recomendado pela legislação brasileira como padrão de lançamento ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). O teste de toxicidade mostrou que o fungo *Aspergillus niger* AN 400 foi capaz de crescer em todas as concentrações de manipueira testadas, as quais variaram de 5% a 100%. Na etapa II houve remoção de demanda química de oxigênio de 91,19% e de 96,75% de cianeto, em 168 h de operação. A maior produção de ácido cítrico ( $2,86 \text{ g.L}^{-1}$ ) ocorreu no reator que continha manipueira diluída a 50% e fontes de nitrogênio: uréia, peptona e sulfato de amônia, na concentração de  $5 \text{ g.L}^{-1}$ . Na etapa com biomassa imobilizada houve produção de ácido cítrico de  $0,84 \text{ g.L}^{-1}$ , apenas no ciclo 4. Entretanto, a remoção de cianeto, alcançou 98,43%, em 48 h de reação, neste mesmo ciclo. Concluiu-se que o fungo *Aspergillus niger* AN400 conseguiu crescer em todas as concentrações de manipueira, a adição de nitrogênio foi mais importante do que a adição de sacarose para a produção de ácido cítrico. A maior variação de pH foi observada na fase de biomassa imobilizada, que coincidiu com a maior remoção de cianeto. A concentração de cianeto e de DQO do efluente final estão de acordo com os limites requeridos pela legislação brasileira.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*. Ácido cítrico. Cianeto. Fermentação Submersa. Manipueira.

## ABSTRACT

Manipueira, waste generated from the processing of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is usually discarded erratically on the environment, becoming a serious environmental problem, as it pollutes rivers and soils with high organic load and the presence of cyanide. This study focus on the capacity from the use of cassava to reduce cyanide e organic material and to produce citric acid as a substrate by the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 in aerobic reactors operated in batch with the use of manipueira. The experiment consisted in three steps: Step I test toxicity; stage II operation reactors of biomass dispersed with different nutritional conditions under agitation of 120 rpm in orbital shaker table; and stage III operation in aerobic reactor containing immobilized fungal biomass in polyurethane foam cubes with the best conditions in the first phase. The analyzes proposed for monitoring process were the chemical oxygen demand (COD), pH, total volatile solids, citric acid and cyanide. The manipueira used in this study had a high concentration of COD ( $65000 \text{ mg.L}^{-1}$ ), which shows its high polluting power, and also cyanide concentration ( $7.75 \text{ mg L}^{-1}$ ) that is above than is recommended by Brazilian law as release pattern ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ). The toxicity tests showed that the fungi *Aspergillus niger* AN 400 was able to grow at all concentrations of tested manipueira, ranging from 5% to 100%. In stage II have had removal of chemical oxygen demand of 91.19% and 96.75% of cyanide with 168 hours of operation. The maximum production of citric acid ( $2.86 \text{ g L}^{-1}$ ) occurred in the reactor that contained diluted manipueira 50% and nitrogen sources: urea, peptone and ammonium sulfate at a concentration of  $5 \text{ g L}^{-1}$  when compared to the behavior of other reactors, in 168 hours of experiment. In step immobilized biomass, there was production of  $0,84 \text{ g.L}^{-1}$  of citric acid only in cycle 4. However, removal of cyanide reached 98.43% at 48 h in the same reaction cycle. It follows that the fungus *Aspergillus niger* AN400 was able to grow at all concentrations of cassava, the addition of nitrogen was more important than the addition of sucrose for the production of citric acid. The higher hydrogenionic potential change was observed in the immobilized biomass phase, coinciding with the greater removal of cyanide. The process of using the *A. niger* has shown to be efficient in cyanide removal in both dispersed and immobilized biomass. The concentration of cyanide and COD of effluents comply with the limits required by Brazilian law.

**Keywords:** *Aspergillus niger*. Citric Acid. Cyanide. Submerged fermentation. Manipueira.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Apresentação da raiz da mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz) recém coletada. ...                                                                                                 | 19 |
| Figura 2 – Aspecto líquido da manipueira extraída da raiz da mandioca. ....                                                                                                                        | 21 |
| Figura 3 - Estrutura da linamarina e da lotaustralina.....                                                                                                                                         | 25 |
| Figura 4 - Processo de cianogênese. ....                                                                                                                                                           | 25 |
| Figura 5- Eletromicrografia de varredura da estrutura do órgão de frutificação de <i>Aspergillus niger</i> . ....                                                                                  | 32 |
| Figura 6 - Fórmula estrutural do ácido cítrico.....                                                                                                                                                | 39 |
| Figura 7- Esquema simplificado da glicólise para acúmulo de ácido cítrico no Ciclo de Krebs. ....                                                                                                  | 40 |
| Figura 8- (a) CETREX; (b) Cultivares de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> Crantz). ....                                                                                                          | 43 |
| Figura 9- (a) Coleta das mandiocas; (b) Bagaço; (c) Manipueira extraída. ....                                                                                                                      | 44 |
| Figura 10- Produção de inóculo adaptado a partir de cultivo em manipueira, em meio não esterilizado (NE) e esterilizado (E), nas concentrações de 0,5%, 1%, 5%, 20%, 30%, 50%, 80% e 100% v/v..... | 45 |
| Figura 11– (a) Reatores autoclavados; (b) Reatores em operação. ....                                                                                                                               | 48 |
| Figura 12 – RBS com biomassa fúngica imobilizada.....                                                                                                                                              | 49 |
| Figura 13- Verificação das placas de Petri contendo meio de cultura PDA, sem manipueira e sem fungos (Branco), ao longo do teste de toxicidade. ....                                               | 55 |
| Figura 14- Crescimento de colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em placas de Petri contendo meio PDA (Controle). ....                                                                        | 56 |
| Figura 15- Crescimento de colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em placas de Petri contendo manipueira diluída em água a 5% (v/v). ....                                                      | 57 |
| Figura 16- Crescimento de colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em placas de Petri contendo manipueira diluída em água a 10% (v/v). ....                                                     | 57 |
| Figura 17- Crescimento de colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em placas de Petri contendo manipueira diluída em água a 25% (v/v). ....                                                     | 58 |
| Figura 18- Crescimento de colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em placas de Petri contendo manipueira diluída em água a 50% (v/v). ....                                                     | 58 |
| Figura 19- Crescimento de colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em placas de Petri contendo manipueira diluída em água a 70% (v/v). ....                                                     | 59 |
| Figura 20- Crescimento de colônias de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 em placas de Petri contendo manipueira a 100%. ....                                                                          | 59 |

|                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 21- Imagens de leveduras presentes nos reatores não esterilizados (NE) após tempo reacional de 14 dias, fotografadas a partir de microscópio óptico com aumento de 100 X (a) e de 400 X (b).....                                       | 60 |
| Figura 22 - Imagens de biomassa filamentosa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 presentes nos reatores esterilizados a 100 % (v/v) fotografadas a partir de microscópio óptico com aumento de 100 X (Figura 23a) e de 400 X (Figura 23b). .... | 61 |
| Figura 23- Variação do pH nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante 168 h de experimento. ....                                                            | 62 |
| Figura 24- Cinética de decaimento de DQO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante 168 h de experimento. ....                       | 64 |
| Figura 25 – Eficiência de remoção de matéria orgânica (%) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante 168 h de experimento. ....                            | 64 |
| Figura 26- Variação de ácido cítrico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 no TR de 168 h. ....                                         | 66 |
| Figura 27- Cinética de decaimento de cianeto ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante 168 h de experimento. ....                  | 69 |
| Figura 28- Eficiência de remoção de cianeto em % nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante 168 h de experimento. ....                                     | 69 |
| Figura 29- Variação de pH nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento. ....                                                                              | 71 |
| Figura 30- Cinética de decaimento de DQO ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento. ....                                        | 73 |
| Figura 31- Eficiência de remoção de DQO (%) nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento. ....                                                            | 73 |
| Figura 32- Variação de ácido cítrico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) obtidos nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 com TR de 48 h. ....                                                                  | 75 |

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 33- Cinética de decaimento e eficiência de remoção de cianeto nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento. .... | 77 |
| Figura 34- Eficiência de remoção de cianeto em % nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento. ....                     | 78 |
| Figura 35 - Ensaio de adsorção do cianeto ao meio suporte. ....                                                                                                                                             | 79 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Composição média da manipueira comparada de diferentes artigos. ....                                                                                                                                                                     | 22 |
| Tabela 2 - Caracterização da Manipueira proveniente da extração da farinha e da fécula. ....                                                                                                                                                        | 24 |
| Tabela 3 - Elementos químicos necessários para o metabolismo fúngico. ....                                                                                                                                                                          | 35 |
| Tabela 4 - Composição química da Solução de Vishniac. ....                                                                                                                                                                                          | 46 |
| Tabela 5. Organização experimental dos grupos de reatores com biomassa dispersa. ....                                                                                                                                                               | 48 |
| Tabela 6 - Caracterização da primeira manipueira extraída da mandioca fornecida pelo CETREX. ....                                                                                                                                                   | 53 |
| Tabela 7 - Composição média da manipueira extraída desta pesquisa comparada com a de outros autores. ....                                                                                                                                           | 54 |
| Tabela 8 - Cinética de decaimento e eficiência de remoção de DQO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante 168 h de experimento. ....     | 65 |
| Tabela 9 - Cinética de decaimento e eficiência de remoção de cianeto ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante 168 h de experimento. .... | 70 |
| Tabela 10 - Cinética de decaimento e eficiência de remoção de DQO nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante quatro ciclos de 48 h de experimento. ....                                           | 74 |
| Tabela 11 - Cinética de decaimento e eficiência de remoção de cianeto nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de <i>Aspergillus niger</i> AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento. ....                                        | 78 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                    |                                                                                                                          |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| % MS               | Porcentagem massa sólido                                                                                                 |
| Acetil-CoA         | Acetil coenzima A                                                                                                        |
| ATP                | Adenosina trifosfato                                                                                                     |
| CERAT              | Centro de Raízes e Amidos Tropicais                                                                                      |
| CETREX             | Centro de Ensino e Treinamento em Extensão                                                                               |
| CONAMA             | Conselho Nacional de Meio Ambiente                                                                                       |
| DBO                | Demanda bioquímica de oxigênio                                                                                           |
| DQO                | Demanda química de oxigênio                                                                                              |
| EDTA               | Etilenodiamino tetra-acético                                                                                             |
| FAO                | Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) |
| NADPH <sub>2</sub> | Fosfato de di-hidrogenofosfato de adenina dinucleótido nicotinamida                                                      |
| OMS                | Organização Mundial da Saúde                                                                                             |
| PA                 | Para análise                                                                                                             |
| PDA                | Potato dextrose agar (Ágar batata dextrose)                                                                              |
| Ph                 | Potencial hidrogeniônico                                                                                                 |
| PPM                | Partes por milhão                                                                                                        |
| RPM                | Rotação por minuto                                                                                                       |
| SSV                | Sólidos suspensos voláteis                                                                                               |
| TR                 | Tempo de reação                                                                                                          |
| UASB               | Upflow Anaerobic Sludge Blanket (Reator anaeróbio de manta de lodo)                                                      |
| UNESP              | Universidade Estadual Paulista                                                                                           |
| V cam              | Volume total da câmara                                                                                                   |

## SUMÁRIO

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                                                      | 15 |
| 2 OBJETIVOS .....                                                                                      | 17 |
| 2.1 Objetivo geral.....                                                                                | 17 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                          | 18 |
| 3.1 Cultivo da mandioca .....                                                                          | 18 |
| 3.2 Subprodutos do processamento da mandioca .....                                                     | 20 |
| 3.3 Manipueira .....                                                                                   | 21 |
| 3.3.1 <i>Potencial poluidor</i> .....                                                                  | 23 |
| 3.3.2 <i>Potencial tóxico</i> .....                                                                    | 25 |
| 3.3.3 <i>Tratamento e potencial econômico</i> .....                                                    | 27 |
| 3.4 Fungos.....                                                                                        | 29 |
| 3.4.1 <i>Aspergillus niger</i> .....                                                                   | 31 |
| 3.4.2 <i>Nutrição Fúngica</i> .....                                                                    | 32 |
| 3.4.3 <i>Biodegradação Fúngica</i> .....                                                               | 35 |
| 3.4.4 <i>Viabilidade de esporos e quebra de dormência</i> .....                                        | 38 |
| 3.5 Ácido cítrico .....                                                                                | 39 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS .....                                                                            | 43 |
| 4.1 Coleta da mandioca e extração da manipueira .....                                                  | 43 |
| 4.2 Caracterização da manipueira .....                                                                 | 44 |
| 4.3 Etapa I – Teste de toxicidade.....                                                                 | 44 |
| 4.4 Adaptação do micro-organismo à manipueira.....                                                     | 45 |
| 4.5 Produção da suspensão de esporos .....                                                             | 46 |
| 4.6 Etapa II - Operação em reatores em bateladas com biomassa fúngica dispersa. ....                   | 47 |
| 4.7 Etapa III - Operação em reator em batelada sequencial (RBS) com biomassa fúngica imobilizada. .... | 49 |
| 4.8 Análises Espectrofotométricas.....                                                                 | 50 |

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.8.1 Determinação de ácido cítrico .....</b>                                   | <b>50</b> |
| <b>4.8.2 Determinação do cianeto livre.....</b>                                    | <b>50</b> |
| <b>4.8.3 Quantificação de açúcar redutor.....</b>                                  | <b>51</b> |
| <b>4.9 Estimativa de parâmetros cinéticos aparentes.....</b>                       | <b>51</b> |
| <b>4.10 Teste de adsorção do cianeto ao meio suporte.....</b>                      | <b>52</b> |
| <b>5.1 Caracterização da manipueira .....</b>                                      | <b>52</b> |
| <b>5.2 Teste de toxicidade .....</b>                                               | <b>55</b> |
| <b>5.3 Adaptação do micro-organismo à manipueira.....</b>                          | <b>60</b> |
| <b>5.4.1 Potencial hidrogeniônico (pH).....</b>                                    | <b>61</b> |
| <b>5.4.2 DQO.....</b>                                                              | <b>63</b> |
| <b>5.4.3 Ácido Cítrico .....</b>                                                   | <b>66</b> |
| <b>5.4.4 Cianeto.....</b>                                                          | <b>68</b> |
| <b>5.5 Operação em Reatores em Bateladas com biomassa fúngica imobilizada.....</b> | <b>71</b> |
| <b>5.5.1 pH .....</b>                                                              | <b>71</b> |
| <b>5.5.2 DQO.....</b>                                                              | <b>72</b> |
| <b>5.5.3 Ácido Cítrico .....</b>                                                   | <b>75</b> |
| <b>5.5.4 Cianeto.....</b>                                                          | <b>76</b> |
| <b>5.5.5 Contagem de colônias .....</b>                                            | <b>79</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>                                                           | <b>80</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                            | <b>81</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de alimentar os sete bilhões de pessoas no mundo vem exigindo o aumento da produção de alimentos. Nesse contexto, estão os produtos da cesta básica, dentre os quais, a mandioca se insere como uma das principais fontes alimentares devido à facilidade de se adaptar às mais diversas condições de solo e clima (GROXKO, 2013).

A Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas. Trata-se de um alimento de primeira necessidade na maior parte das regiões tropicais, tendo crescido em uma gama de climas e altitudes, assim como em uma ampla variedade de solos (CEPLAC, 2011). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de mandioca continua em ritmo acelerado, sendo que, esse expressivo crescimento, deve-se principalmente a forte contribuição do continente africano (FAO, 2013).

A produção brasileira se estagnou durante a última década, mas ainda é responsável pela produção de 22 a 25 milhões de toneladas dessa raiz por ano, estando presente em todas as regiões do país, sendo que se concentra principalmente no Nordeste, região que apresenta excelentes condições climáticas para o desenvolvimento dessa planta, um dos fatores que torna a mandioca a principal fonte energética para grande contingente populacional, não apenas na região em questão, como também no norte do país (GROXKO, 2013).

A parte mais importante da mandioca é a raiz, rica em fécula, que utilizada na alimentação humana e animal ou como matéria prima para diversas indústrias. Porém, o processo de beneficiamento da mandioca gera resíduo líquido de caráter potencialmente poluidor, a manipueira, que é extremamente prejudicial ao ambiente, não só por possuir demanda bioquímica de oxigênio (DBO) elevada, como também pelas altas concentrações de ácido cianídrico, potássio, magnésio, cálcio e fósforo (CAMILI, 2007).

A manipueira, seja oriunda de casas de farinha ou da produção de fécula, apresenta ainda toxicidade elevada, atribuída aos glicosídeos cianogênicos, destacando-se entre os mesmos a linamarina e lotaustralina que sofrem hidrólise causada pela enzima *linamarase* originando o ácido cianídrico (HCN) (LIMA, 2010).

Diante do exposto, há necessidade de reduzir o potencial poluidor da manipueira, removendo sua carga orgânica elevada, bem como o grau de toxicidade, os quais podem comprometer a microbiota do solo e os ecossistemas aquáticos, no caso de descarte inadequado, minimizando, desta forma, seu impacto no meio ambiente.

Em assim sendo, diversas pesquisas têm sido feitas visando ao seu tratamento, porém, outro aspecto a ser considerado, é a possibilidade de obter energia alternativa pela geração de produtos de interesse econômico, como enzimas e ácidos orgânicos.

A produção de ácidos orgânicos é bem relatada, particularmente, a de ácido cítrico. Vários trabalhos reportam o uso do fungo *Aspergillus niger* na produção de ácido cítrico, importante composto que é utilizado como conservante de alimentos no setor de indústrias alimentícias. A produção mundial desse ácido orgânico é crescente, o que o torna um produto de grande interesse comercial (ROCHA, 2009; GOSH, 2013).

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são capazes de crescer em meio de cultura de baixo custo (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011) e, dependendo das condições do cultivo, podem produzir ácido cítrico (ROCHA 2009; GOSH, 2013), de modo que a manipueira poderia deixaria de ser resíduo poluente, transformando-se em insumo para produção de ácido cítrico.

Desta forma, o trabalho visou verificar o potencial da linhagem do *Aspergillus niger* AN 400 em reduzir a carga poluidora e o teor de cianeto da manipueira a níveis considerados satisfatórios pela legislação brasileira, e ainda observar a produção de ácido cítrico, em bateladas com biomassa dispersa e imobilizada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar o potencial de *Aspergillus niger* AN 400 em reduzir a carga poluidora da manipueira, bem como produzir ácido cítrico em reatores em bateladas com biomassa dispersa e imobilizada.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade da manipueira ao crescimento *Aspergillus niger* AN 400 nas concentrações de 5%, 10%, 25%, 50%, 70% e 100%;
- Determinar a influência da presença e ausência de sacarose na produção de ácido cítrico durante o tratamento da manipueira nos reatores com biomassa fúngica dispersa e imobilizada;
- Verificar a influência da variação do pH inicial da manipueira sobre a produção do ácido cítrico e remoção de demanda química de oxigênio (DQO);
- Determinar a eficiência de remoção de cianeto pela ação do fungo durante o processo de tratamento da manipueira nos reatores em batelada;
- Avaliar a influência do tipo de crescimento do *Aspergillus niger* AN 400 (disperso ou imobilizado) na produção de ácido cítrico durante o tratamento da manipueira;
- Verificar se a concentração de cianeto e DQO no efluente final está dentro dos limites requeridos pela legislação brasileira.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico serão abordados assuntos relevantes à mandioca, tais como: surgimento, cultivo, produção e usos no cenário nacional e a nível mundial, além da sua importância econômica no Brasil e no restante do globo. Serão detalhados ainda os subprodutos derivados da mandioca, assim como seus resíduos sólidos e líquidos oriundos do processamento da raiz, com ênfase na manipueira, abordando seu potencial tóxico e poluidor, além de formas de tratamento deste poluente e sua utilização econômica.

Serão abordados também assuntos relacionados aos fungos, tais como: seu tipo de nutrição, biodegradação fúngica, viabilidade de esporos e quebra de dormência, dando especial atenção ao *Aspergillus niger*.

Por fim serão discutidas a importância econômica do ácido cítrico, o histórico desde o seu descobrimento até as principais formas de obtenção deste ácido orgânico, com ênfase à produção por fungos.

#### 3.1 Cultivo da mandioca

A Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (Figura 1), planta perene e arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas, é uma das principais fontes alimentares no mundo, sendo na África considerada um alimento de segurança nacional, alimentando cerca de 60% de sua população, principalmente, os mais carentes (GROXKO, 2013). Segundo a Organização das nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2013), a produção mundial continua em ritmo acelerado de crescimento, devendo-se principalmente ao continente africano.

Já na América do Sul, cujo volume de produção alcançou 34,5 milhões de toneladas em 1970, estagnou nos anos seguintes na média de 30 milhões de toneladas, destaque ao Brasil que naquele ano produziu cerca de 30 milhões de toneladas e participou com 30% da produção mundial. Porém, no ano de 2013, a sua cota caiu para apenas 8%. A produção brasileira se estagnou durante a última década na faixa de 22 a 25 milhões de toneladas, mas ainda continua representando uma importante fonte de alimento no país (GROXKO, 2013).

Figura 1 – Apresentação da raiz da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) recém coletada.



Fonte: Autor (2014).

O Brasil já foi o maior produtor mundial de mandioca, em 1970. Na sequência, perdeu a hegemonia para a Nigéria, mais tarde cedeu o 2º e o 3º lugar para a Indonésia e a Tailândia. A produção brasileira de mandioca havia se estabilizado em torno de 25 milhões de toneladas, porém na safra de 1012/13 a redução foi mais acentuada por conta da forte seca nos estados do Nordeste. Em função disso, a produção brasileira em 2013 alcançou apenas 21 milhões de toneladas que significou a menor produção dos últimos 10 anos (GROXKO, 2013).

Na safra 2014/2015 a área destinada à cultura da mandioca no país foi de aproximadamente um milhão e seiscentos mil hectares, com produção de vinte e quatro milhões de toneladas, totalizando um rendimento médio de aproximadamente 15 t ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2015). Diferentemente de outras culturas, como café, algodão e o trigo que são restritas a determinadas regiões, o cultivo da mandioca está presente em todos os estados brasileiros. Sua adaptabilidade as mais diversas condições edafoclimáticas do país garante à cultura da mandioca o sucesso de sua exploração (GROXKO, 2013).

Mesmo estando presente em todo o Brasil, existe uma diferenciação no tocante ao uso da produção. No Nordeste e no Norte, por exemplo, o principal destino é o consumo humano onde se pode constatar que mais de 90% é consumida na forma de farinha, biju, polvilho doce e vários outros produtos extraídos da principal matéria prima que é a raiz e também as folhas que compõe um famoso prato chamado de “pato no tucupi”. Outra grande

semelhança nessas regiões é a grande quantidade de fábricas de farinha, em sua maioria de pequeno porte, com pouca tecnologia e que predomina ainda a utilização de mão de obra braçal em todo o processo produtivo (GROXKO, 2013).

### **3.2 Subprodutos do processamento da mandioca**

Um dos fatores que determina a forma de aproveitamento das raízes de mandioca é seu teor de compostos cianogênicos, variável para diferentes cultivares da mesma. Assim, as raízes de cultivares que apresentam baixo teor de compostos cianogênicos, popularmente denominadas de mandiocas “mansas”, podem ser consumidas cozidas ou fritas. As raízes de cultivares com elevado teor de compostos cianogênicos, denominadas mandiocas “bravas”, são destinadas ao processamento industrial, principalmente na forma de farinha e fécula (PINTO, 2008).

De acordo com Amaral, Jaigobind e Jaisingh (2007), os principais produtos resultantes do processamento industrial da mandioca são: farinha de mandioca; fécula; polvilho doce; polvilho azedo e outros amidos modificados. No Brasil, a farinha tem se destacado como principal forma de uso da mandioca. Com relação à fécula, são utilizados dois terços seus nas indústrias agroalimentares. O polvilho doce, bem como o azedo, é aplicado na indústria alimentícia, na fabricação de biscoitos de polvilho e pão de queijo, principalmente.

A fécula entra na composição de vários produtos, destacando-se como principais os da indústria frigorífica, de papel e papelão e de massa alimentícia, com produtos como bolachas, biscoitos, pães e pão de queijo. A indústria alimentícia é a que mais cresce e certamente demandará maiores volumes, em especial de polvilho azedo (GROXKO, 2013).

O processamento industrial da mandioca gera quantidades significativas de resíduos que causam sérios problemas ambientais. Indústrias de médio e grande porte chegam a processar 300 toneladas de mandioca por dia, gerando grande quantidade de resíduos sólidos e líquidos. Em relação aos resíduos sólidos resultantes do processamento da mandioca podem-se citar cascas, fibras, bagaço e outros materiais sólidos que não são vistos como problema ambiental, pois usualmente são utilizados como complemento na alimentação animal (MENDONÇA PINTO e CABELLO, 2011).

Já em relação aos resíduos líquidos gerados no processamento da mandioca, pode-se ter (INOUE, 2008):

- Manipueira: resíduo líquido de aspecto leitoso de cor amarelada, resultante do

processo de obtenção de fécula, cujo volume é gerado substancialmente nas etapas de moagem da mandioca e extração do amido, operações que fazem uso da água;

- Água de lavagem das raízes: tem na sua constituição a presença predominante de terra (sólidos suspensos) e pedaços de cascas, produzidos na fase de descascamento da mandioca. É caracterizada pelo teor baixo de matéria orgânica (suspensão ou dissolução) originária das raízes e carregada pela água devido à maceração. Na água de lavagem, devido ao processo concomitante de descascamento, observa-se a presença de manipueira em menores proporções, não sendo predominante.

### 3.3 Manipueira

Manipueira, vocabulário indígena incorporado à língua portuguesa e significa “o que brota da mandioca”, é o líquido de aspecto leitoso e cor amarela (Figura 2) que escorre das raízes amiláceas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) por ocasião da prensagem da massa ralada das mesmas (MAGALHÃES, 1998). A manipueira é um resíduo líquido produzido no processo de fabricação de farinha de mesa e extração da fécula da mandioca (*Manihot esculenta*) rico em açúcares, amidos, proteínas, linamarina, sais e outras substâncias (DUARTE *et al.*, 2012).

Figura 2 – Aspecto líquido da manipueira extraída da raiz da mandioca.



Fonte: Autor (2014).

Um importante fator que influencia nas características da manipueira é a junção deste efluente com a água de lavagem das raízes, que é originária dos lavadores e descascadores de mandioca e carrega em suspensão a terra e as cascas que podem ser separadas por decantação e peneiramento (CEREDA, 2001). Segundo Mendonça Pinto e Cabello (2011), a água de lavagem de raiz contribui com volume médio de  $2,6/m^3$ , enquanto que a água de extração de fécula contribui com volume médio de  $3,6/m^3$  por tonelada de mandioca processada.

Na Tabela 1, pode ser visualizada a comparação de diferentes variáveis referentes à manipueira em alguns trabalhos nos quais se fez a sua caracterização, sendo realizadas as análises de sólidos totais, sólidos voláteis, DQO (demanda química de oxigênio), cianeto total, nitrogênio, carbono, fósforo, potássio, cálcio, enxofre, magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês.

Tabela 1 - Composição média da manipueira comparada de diferentes artigos.

| UNIDADES           | VARIÁVEIS        | AUTORES          |                               |                  |                  |
|--------------------|------------------|------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
|                    |                  | CEREDA<br>(1994) | FERNANDES<br>JÚNIOR<br>(1995) | BARANA<br>(1995) | BARANA<br>(2000) |
| % MS               | Sólidos Totais   | 6,28             | 6                             | 4,51             | 5,54             |
|                    | Sólidos Voláteis | 5,23             | 5,4                           | 3,83             | 4,76             |
| mg.L <sup>-1</sup> | DQO              | 63000            | 69300                         | 60000            | 62300            |
|                    | Cianeto Total    | 444              | 206,83                        | 140,7            | 112,2            |
|                    | Nitrogênio       | 4900             | 2000                          | 3000             | 1242             |
|                    | Carbono          | 37000            | 35000                         | 35000            | 12330            |
|                    | Fósforo          | 160              | 250                           | 300              | 326              |
|                    | Potássio         | .863             | 2810                          | 3800             | 1972             |
|                    | Cálcio           | 227              | 200                           | 400              | 838              |
|                    | Enxofre          | 195              | 78                            | 200              | 60               |
|                    | Magnésio         | 405              | 290                           | 600              | 326              |
|                    | Ferro            | 15,3             | 7,0                           | 6,4              | 12,4             |
|                    | Cobre            | 1,1              | 1,2                           | 1,4              | 3,1              |
|                    | Zinco            | 4,0              | 3,0                           | 5,0              | 32,5             |
|                    | Manganês         | 3,7              | 3,3                           | 3,5              | 2,2              |

Fonte: Adaptada de Barana (2000).

Verificou-se, ao comparar os diferentes trabalhos presentes na Tabela 1, que há altas taxas de DQO que variam de 60.000 mg.L<sup>-1</sup> a quase 70.000 mg.L<sup>-1</sup>. Além de grande quantidade de cianogênicos e de nitrogênio, que juntamente com outros constituintes, pode ter suas quantidades diferentes, devido às condições edáfico-morfológica, além do clima, irrigação dentre outros fatores citados pelos autores em seus trabalhos. Considera-se também que há distinção das características desse resíduo líquido quando se faz o processamento de diferentes cultivares de mandioca que são encontrados nas diversas regiões do país.

Segundo Sun *et al.* (2012), uma fecularia pode gerar de 20 a 60 m<sup>3</sup> de manipueira por tonelada de mandioca processada, sendo este o resíduo mais problemático por possuir elevada carga poluente, com altos valores de demanda química de oxigênio (DQO de 10496 mg.L<sup>-1</sup>) e de demanda bioquímica de oxigênio (DBO de 6300 mg.L<sup>-1</sup>), além de potencial tóxico devido à presença de cianeto (2,3 mg.L<sup>-1</sup>).

### **3.3.1 Potencial poluidor**

A manipueira, seja oriunda de casas de farinha ou da produção de fécula, apresenta um elevado potencial poluidor atribuído à toxidez e a grande quantidade de matéria orgânica presente na sua composição. Destaca-se que a manipueira é o efluente mais poluente quanto à agressão a natureza e a sua toxicidade, em função de sua elevada concentração de matéria orgânica e pela presença de compostos que liberam ácido cianídrico (CEREDA, 2001; SUN *et al.*, 2012).

A maior parte da matéria orgânica da manipueira é devida à presença de açúcares solúveis. Segundo Damasceno, Cereda e Pastore (2001), a composição média da manipueira em carbono é de 58.180 mg. L<sup>-1</sup> de açúcares totais, dos quais 37.960 g. L<sup>-1</sup> são de açúcares redutores: 14.900 g. L<sup>-1</sup> de frutose, 22.340 g.L-1 de glicose e 720 mg.L-1 de maltose; e 20.220 mg. L<sup>-1</sup> de açúcares não-redutores: 1520 mg. L<sup>-1</sup> de dextrinas e 18.700 mg. L<sup>-1</sup> de sacarose. Já Leonel e Cereda (1995) relataram a presença de 5,71% de amido e 2,93% de açúcares redutores totais na manipueira coletada na prensa, antes do processo de decantação.

Para Barana (2008), o potencial poluente da manipueira também deve-se a carga orgânica que pode chegar a 50.000 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 2). Esta autora determinou os teores dos açúcares glicose e frutose em dez lotes de manipueira da Farinheira Plaza em Santa Maria da Serra, SP. Em seus resultados a manipueira chegou a apresentar 14.700 mg. L<sup>-1</sup> de glicose que correspondeu a 29% da matéria orgânica presente e 22.000 mg.L<sup>-1</sup> de frutose equivalente a

42% da matéria orgânica. Por serem açúcares solúveis de fácil fermentação, degradam-se rapidamente a ácidos orgânicos. Esta característica inviabiliza o tratamento deste resíduo por processos físicos.

O potencial poluidor da manipueira pode variar de acordo com a sua origem no processamento da mandioca. O que pode ser observado na Tabela 2, na qual a manipueira “*in natura*”, oriunda diretamente da prensagem da raiz de mandioca tem um potencial poluidor de 25 vezes a do esgoto doméstico. A manipueira de fecularia é mais diluída, conserva, porém, um potencial poluidor de aproximadamente 12,5 vezes a do esgoto doméstico, o que é agravada pela quantidade gerada.

Tabela 2 - Caracterização da Manipueira proveniente da extração da farinha e da fécula.

| UNIDADES           | VARIÁVEIS | PROCESSO DE ORIGEM<br>DA MANIPUEIRA |           |                  |
|--------------------|-----------|-------------------------------------|-----------|------------------|
|                    |           | FARINHEIRA                          | FECULARIA | ESGOTO DOMÉSTICO |
| mg.L <sup>-1</sup> | DQO       | 50000                               | 25000     | 2000             |
| mg.L <sup>-1</sup> | HCN       | 140                                 | 80        | -----            |

Fonte: Barana (2008).

Apesar da disponibilidade de vários sistemas para o tratamento de efluentes líquidos, a indústria da mandioca faz parte de um segmento que ainda não permite grandes investimentos em tecnologia para o tratamento dos seus efluentes. (MENDONÇA PINTO e CABELLO, 2011). Com isso temos que grande parte da manipueira, com seu enorme potencial poluidor é despejada diretamente no rio, que segundo Barana (2008) pode levá-lo ao colapso, principalmente devido a dois tipos de impactos:

1- Alteração da capacidade de autodepuração, fenômeno pelo qual o rio se recupera por mecanismos puramente naturais;

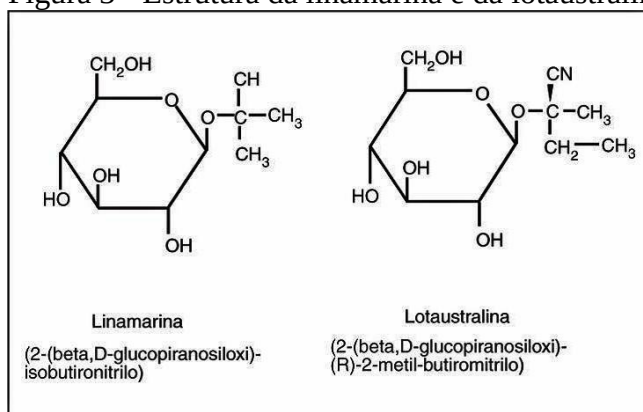
2- Eutrofização, que ocorre do crescimento excessivo de algas, devido ao excesso de nitrogênio e fósforo.

De qualquer forma, pode-se afirmar que a manipueira não deve ser jogada nos corpos d'água, de forma alguma. De acordo com Barana (2008), mesmo que o processo de descontaminação do resíduo tenha uma eficiência de 90%, os 10% restantes ainda são algumas vezes superiores à atividade poluidora do esgoto doméstico.

### 3.3.2 Potencial tóxico

Em relação à toxicidade da mandioca, temos que, a mandioca contém dois glicosídeos cianogênicos (Figura 3): linamarina (ocorrendo em maior frequência) e lotaustralina em todas as partes da planta, exceto nas sementes (KANNANGARA *et al.* 2011). Ambos sofrem hidrólise causada pela enzima linamarase originando o ácido cianídrico (HCN) (LIMA, 2010).

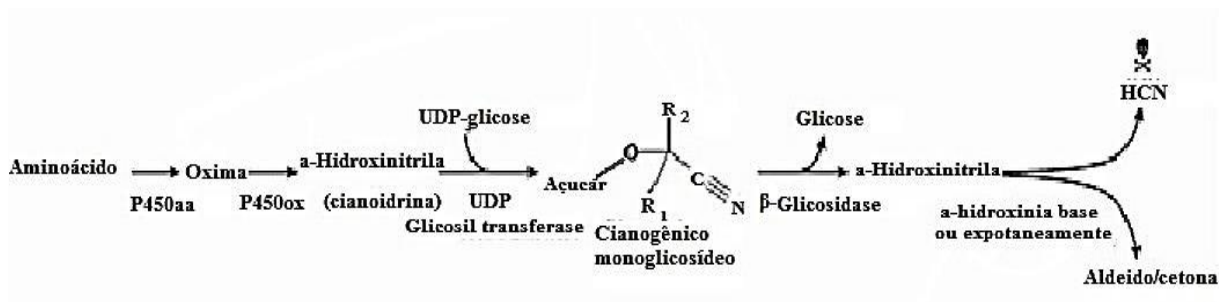
Figura 3 - Estrutura da linamarina e da lotaustralina



Fonte: Adaptado de Neilson *et al.* (2013).

A geração de cianeto livre ocorre no processamento da mandioca. Gleadow & Moller (2014) afirmam que o início do processo de cianogênese se dá pela dilaceração do tecido vegetal liberando a linamarina, sendo posteriormente hidrolisada enzimaticamente por  $\beta$ -glicosidases, dentre as quais destaca-se a linamarase, enzima autóctone da mandioca, HCN glicosídicos são compostos estáveis, no entanto, quando a ligação  $\beta$ -glicosídica é rompida pela ação de uma  $\beta$ -glicosidase, a cianoidrina resultante se dissocia para formar ácido cianídrico, conforme Figura 4.

Figura 4 - Processo de cianogênese.



Fonte: Adaptado de Gleadow & Moller (2014).

A ingestão de mandioca não processada com altos níveis de HCN combinado com uma dieta deficiente em aminoácidos contendo enxofre pode levar à intoxicação crônica, uma vez que esses aminoácidos são necessários à detoxificação de cianetos. A ação tóxica do cianeto na forma livre nos animais superiores explica-se pela afinidade ao ferro, combinando-se com a hemoglobina para formar a cianohemoglobina. Nas plantas superiores e nos microrganismos o cianeto interfere na fosforilação oxidativas combinando-se com o citocromo oxidase e inibindo o transporte eletrônico, e consequentemente a formação de ATP (adenosina trifosfato) (CEREDA, 2001; JORGENSEN *et al.* 2011).

A magnitude do problema depende da capacidade do processamento e, também do número de indústrias localizadas nas mesmas bacias hidrográficas (MENDONÇA PINTO e CABELLO, 2011).

O íon cianeto é potencialmente tóxico aos micro-organismos, sendo que, em certas concentrações, a influência pode comprometer negativamente a biodegradação do próprio cianeto como de outros compostos biodegradáveis concomitantemente, como observado nos trabalhos de Leonel & Cereda (1995) e Gijzen *et al.* (2000).

Leonel & Cereda (1995), ao verificar a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* utilizado manipueira como substrato, verificaram que em meios contendo teores de cianeto superiores a  $70 \text{ mg.L}^{-1}$  não houve crescimento do micro-organismos.

A FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) e OMS (Organização Mundial da Saúde) em 1998, conforme Amaral, Jaigobind e Jaisingh (2007), estabeleceram o limite de HCN para a intoxicação (dose letal) de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peso vivo, mas esse limite foi estabelecido para HCN inalado, e ocorre que o cianeto presente na mandioca é ingerido, estando assim, na forma de cianeto ligado ou cianeto potencial e não como HCN (ácido cianídrico), desta forma, como o pH do estômago é ácido, a velocidade de hidrólise do cianeto ligado é consideravelmente reduzida.

Para proteger o meio ambiente e corpos d'água, efluentes contendo cianeto de várias indústrias devem ser tratados antes de serem despejados para o meio ambiente. Neste sentido, muitos países e agências ambientais de proteção impuseram normas limitando para descarga de águas residuárias contendo cianeto (DASH, GAUR e BALOMAJUMDER, 2009). Especificamente na legislação brasileira a Resolução 430/2011 do CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) estabelece um padrão de lançamento para o Cianeto Total de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (BRASIL, 2011).

### 3.3.3 Tratamento e potencial econômico

O despejo de efluentes líquidos sem tratamento prévio, em corpos hídricos ainda é prática corriqueira. Contudo, devido à fiscalização pelos órgãos ambientais, as empresas têm sido obrigadas a adotarem medidas para a solução deste problema. Entre estas medidas podem ser citadas a redução das quantidades dos resíduos gerados, utilização de tecnologias que permitam gerar resíduos menos poluentes, tratamento adequado dos resíduos antes da disposição no meio ambiente e o aproveitamento dos resíduos como sub-produtos ou coprodutos para aproveitamento em outras atividades (MENDONÇA-PINTO e CABELLO, 2011).

Visto seu potencial poluidor, principalmente devido à carga orgânica, e ao seu potencial tóxico, devido aos glicosídeos cianogênicos, as características da manipueira evidenciam a importância de submetê-la a um tratamento antes de serem descartadas no meio ambiente, tendo sido realizadas nos últimos anos diversas pesquisas visando otimizar seu tratamento antes do descarte (LIED, 2012).

Segundo Mendonça-Pinto e Cabello (2011), existe ainda, outra preocupação com o pós-tratamento, pois a grande maioria das empresas está instalada em áreas rurais, distante de corpos hídricos com capacidade para recepção de despejos, restando como alternativa a disposição em solo através de fertirrigação. Ferreira *et al.* afirmaram em 2001 que o emprego da manipueira como adubo poderia induzir a redução ou mesmo eliminar o seu despejo sem controle ao ambiente. Ponte já estudara a manipueira em 1999, chegando à conclusão que esta é rica em macronutrientes e alguns trabalhos de pesquisa mostraram efeitos benéficos desse resíduo, quando usado na agricultura como adubo orgânico.

Cardoso *et al.* (2009) corroboraram afirmando que apesar da manipueira ser um resíduo potencialmente poluidor quando descartado de forma inadequada no meio ambiente, a presença de nutrientes, principalmente potássio, nitrogênio, magnésio, cálcio e fósforo, pode viabilizar a sua utilização como biofertilizante na atividade agrícola.

De acordo com Barana (2008), a biodigestão anaeróbia, necessária para a produção de gás a partir da manipueira se inicia na ausência de oxigênio livre, ocorrendo a conversão do substrato manipueira a metano. A manipueira, apesar de se caracterizar como um efluente industrial é um resíduo não esgotado, do ponto de vista do aproveitamento agrícola, de modo que pode ser aplicada no solo e influenciar no equilíbrio iônico, aumentando as concentrações de nutrientes no solo. A predominância do íon potássio ( $K^+$ ) entre os constituintes minerais da manipueira tem implicação direta no desequilíbrio dos

cátions básicos no solo, devido ao aumento de saturação desse elemento e da predisposição à lixiviação de cálcio e magnésio (BARANA, 2000).

As pesquisas no Brasil com biodigestores anaeróbios com objetivo de tratar o resíduo líquido gerado na obtenção de farinha e fécula foram alavancadas pelo CERAT-UNESP/Botucatu/SP. Como visto, os biodigestores são capazes de transformar os resíduos brutos em ácidos orgânicos e depois em biogás. Atualmente, pela riqueza de informações científicas produzidas no Brasil sobre o uso de biodigestores anaeróbios de fases separadas para o tratamento da manipueira, faz com que este sistema seja conhecido, podendo ser construídos em escala real nas empresas (CEZAR, 2008).

De outro lado temos que a preocupação com o elevado consumo de água, a geração de grandes volumes de efluentes, somados às exigências legais, o que tem obrigado as empresas a reavaliar seus processos de forma a melhorar a eficiência, maximizar o aproveitamento de recursos e dispor adequadamente seus resíduos. Contudo, apesar da disponibilidade de vários sistemas para o tratamento de efluentes líquidos, a indústria da mandioca faz parte de um segmento que ainda não permite grandes investimentos em tecnologia para o tratamento dos seus efluentes, havendo ainda a problemática dos glicosídeos cianogênicos presentes nesse líquido (MENDONÇA-PINTO e CABELLO, 2011).

Frequentemente, águas contaminadas por cianeto são tratadas por processos de oxidação biológica. Estas técnicas somente são efetivas para cianeto livre e para aquelas em que as ligações com metais são fracas; contudo em altas concentrações de cianeto o tratamento sofre uma significativa redução de eficiência. Cianeto que está fortemente ligado, ou complexado com metais não podem ser tratados com estes métodos (DASH *et al.*, 2009).

Contudo, com tratamento adequado é possível transformar este resíduo poluente em substrato eficiente para produção de ácido cítrico. A utilização da manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger* foi testada pela primeira vez por CABELLO e CEREDA (1989). Posteriormente, CABELLO (1991) verificou a evolução da produção deste ácido, através de fermentação submersa monitorada por computador e observou a viabilidade do uso da manipueira recém-coletada, enriquecida com sacarose, como substrato para a biossíntese de ácido cítrico.

Leonel e Cereda, (1995) estudaram o uso da manipueira como substrato para biossíntese de ácido cítrico, visto que apresenta características físico-químicas favoráveis ao crescimento do fungo *Aspergillus niger*, com alto potencial de rendimento na conversão.

Além de ácidos orgânicos, existe ainda a possibilidade de produção de enzimas extracelulares, como *lacase*, comuns no metabolismo fúngico, visto que se tem na literatura

diversos estudos nos quais há a produção de enzimas utilizando *Aspergillus niger* (ANDRADE, 2013) agregando valor ao que antes seria descartado na natureza, dando uma destinação nobre a um potencial poluente.

### 3.4 Fungos

Os fungos foram considerados vegetais durante muito tempo e, somente a partir de 1969, passaram a serem classificados em um reino à parte, denominado Fungi. Os fungos apresentam um conjunto de características que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético; não têm celulose na parede celular, exceto alguns fungos aquáticos, e não armazenam amido como substância de reserva. A presença de substâncias quitinosas na parede da maior parte das espécies fúngicas e a capacidade de armazenar glicogênio os assemelham às células animais (TRABULSI *et al.*, 2005).

Os primeiros fungos surgiram a cerca de 540 milhões de anos, formando um grupo amplamente diversificado nos dias atuais, sendo classificados de acordo com características evolutivas e/ou morfológicas em cinco grupos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Deuteromycota. Os fungos são eucariontes, tendo consideravelmente mais genes do que as bactérias, o que os tornam mais versáteis em tolerar compostos inibitórios (Van LEEUWEN *et al.*, 2012).

A diversidade microbiana dos fungos é muito grande, são conhecidas em torno de 75.000 espécies de fungos que atuam como os principais agentes decompositores naturais nos mais diversos ambientes. Entretanto, algumas estimativas indicam que possam existir em torno de 1,5 milhão de espécies (KANAGAWA; NEVES, 2011), até a 5 milhões de espécies, o que excederia o número de espécies de plantas em 6 vezes (BLACKWELL, 2011)

Em relação ao número de espécies de fungos nativos que foram identificados ou recolhidos no Brasil não existem registros precisos. Alguns pesquisadores apontam a existência de 4.325 espécies de fungos brasileiros (MINTER; SILVA, 2007). Forzza e colaboradores por sua vez registram 78 ordens, 924 gêneros e 3.608 espécies (FORZZA *et al.*, 2010).

Fungos são seres heterotróficos, unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (filamentosos ou bolores), podendo ser parasitas ou decompositores. Os fungos filamentosos apresentam estruturas tubulares, as hifas, originadas de um único esporo reprodutivo, o

conjunto delas forma estruturas análogas a tecidos, denominados micélios (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Estes micro-organismos destacam-se pela sua capacidade de atacar tecidos vegetais através da secreção de enzimas que degradam biopolímeros tais como polissacarídeos, lignina e proteínas, sendo comum a colonização de troncos de árvores em decomposição por diferentes espécies de fungos. Este grupo de micro-organismos, à semelhança dos estreptomicetos – importante grupo de bactérias, geralmente isoladas do solo e pertencente ao grupo de actinomicetos –, também produz, em condições de metabolismo secundário, variedade de moléculas orgânicas de pequena massa molecular, com diferentes atividades biológicas, como, por exemplo, a antibiótica (PEREIRA JÚNIOR, 2008).

Os fungos filamentosos se destacam na produção de inúmeros compostos de importância econômica, comercial e biotecnológica, devido à diversidade de ambientes nos quais se adaptam (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; CORTÉS; MOSQUEDA, 2013).

Alguns fungos realizam digestão extracelular e extracorpórea, no qual o micélio segrega enzimas que atuam sobre as substâncias, ocorrendo liquefação, como é o caso dos fungos ligninolíticos. Em outras situações, as hifas diferenciam-se formando os chamados haustórios, que penetram no tecido dos organismos hospedeiros, absorvendo o alimento (MORE *et al.*, 2010).

Os fungos ligninolíticos, do ponto de vista industrial, tornam os carboidratos acessíveis para que sejam utilizados como substratos metabólicos, o que faz com que estes passem de resíduos a matérias primas. Além da incorporação desses resíduos na alimentação animal e na indústria de biocombustíveis, esses podem ser aplicados biotecnologicamente na produção de metabólitos ativos, como alcaloides, antibióticos, enzimas e antioxidantes (JURADO *et al.*, 2011).

Morfologia e características de crescimento fúngico podem explicar em grande parte a sua versatilidade na rápida colonização de diversos substratos (LEITÃO, 2009). Fungos podem formar *pellets* de acordo com vários fatores, tais como composição do meio, concentração do inóculo, intensidade de agitação, fontes de carbono e nitrogênio, entre outros (POSCH, HERWIG; SPADIUT, 2013).

Dentro do Reino Fungi, os táxons decompositores de madeira são particularmente importantes por seu papel na ciclagem de nutrientes nas florestas, além de atuarem como substrato ou fonte de recursos para vários outros organismos que dependem deles (HALME; KOTIAHO, 2011). Eles se subdividem em três grupos distintos: fungos de degradação branca, da degradação marrom e da degradação branda ou macia, de acordo com a morfologia

da degradação. Esses fungos têm importante função ecológica e mais recentemente comercial e industrial, devido serem bastante adaptáveis e possuírem diversos usos (MELO; AZEVEDO, 2008).

### 3.4.1 *Aspergillus niger*

Conforme Wainwright (1995) existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas em processos biotecnológicos. Suas colônias podem apresentar coloração branca, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde.

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* se destacam como excelentes produtores de metabólitos secundários de interesse industrial e ambiental, pois apresentam uma elevada taxa de crescimento e um grande termo tolerância, o que favorece estudos de seleção e produção de bioprodutos de alto valor agregado (ZEN *et al.*, 2014).

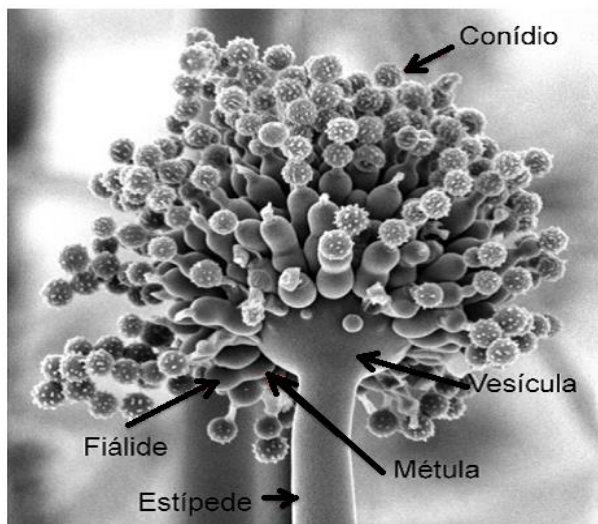
O fungo filamentoso *Aspergillus niger* é uma espécie fúngica do gênero *Aspergillus* do grupo Ascomycota e causa o mofo preto em frutas e vegetais, sendo um contaminante comum de alimentos, que é classificado como fungo de decomposição branda ou mole e pode degradar de forma lenta a lignina e polissacarídeos, estando entre os micro-organismos mais importantes na indústria de biotecnologia, apresentando longo histórico em aplicações agro-alimentares (TSANG *et al.*, 2009).

O *Aspergillus niger* é cosmopolita, podendo ser encontrado em ambientes aquosos, aéreos e terrestres; e ainda em organismos vegetais e animais, tolerando uma vasta gama de condições de temperatura, de umidade e pH (ABDELKADER; HAMED, 2013). A ingestão oral de *A. niger* foi considerada como inofensiva pela Organização Mundial de Saúde, o qual abriu a oportunidade para sua utilização na produção industrial de ácidos, produtos farmacêuticos e de enzimas (KAAIJ, 2007).

Quando o *Aspergillus niger* é cultivado em meios artificiais, apresenta crescimento acelerado, sendo suas colônias compostas por micélio aéreo, com conidióforos eretos, distribuídos densamente sobre a superfície do meio, além de grande produção de conídios. As espécies pertencentes ao grupo produzem o aspergilo ou cabeça aspergilar, que consiste em uma haste não septada e estípede, terminando em uma vesícula, sobre a qual nascem às células conidiogênicas, denominadas por fiálides. Estas que por sua vez sintetizam os conídios, bem como as métulas (SAMSON *et al.*, 1995; SANTOS, 2007).

As estruturas morfológicas do corpo de frutificação do fungo podem ser observadas na Figura 5.

Figura 5- Eletromicrografia de varredura da estrutura do órgão de frutificação de *Aspergillus niger*.



Fonte: Adaptado de Tortora, Funk e Case (2005).

O *Aspergillus niger* é conhecido por secretar variedade de enzimas capazes de degradar açúcares e outros compostos de maior complexidade, sendo bastante utilizado para a produção de ácidos orgânicos. O processo fermentativo desse fungo produz várias enzimas a depender do substrato, algumas destas, como proteases, amilases, lacases e enzimas lignolíticas são usadas em aplicações industriais (TSANG *et al.*, 2009), muitas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários, na quebra de compostos aromáticos e no desenvolvimento como produtor de biofármacos (SUN *et al.*, 2007).

### 3.4.2 Nutrição Fúngica

Os fungos obtêm a energia necessária para o seu metabolismo a partir da quebra de compostos orgânicos, cujos responsáveis são as enzimas diversamente secretadas por esses micro-organismos. A capacidade enzimática é uma característica intrínseca de cada espécie, sendo que a prevalência da expressão de uma enzima ou de outra seja dependente tanto da composição do substrato como da espécie fúngica cultivada (PHAN; SABARATNAM, 2011).

Várias enzimas fúngicas têm sido empregadas em processos industriais, em substituição às etapas químicas que demandam grande consumo energético e geram poluentes. Por isso, essas etapas enzimáticas podem ser inseridas nas chamadas tecnologias limpas (SANT'ANNA JÚNIOR, 2010). Tendo crescido o interesse em desenvolver e aperfeiçoar estratégias que possibilitem o melhor controle e predição de resultados em bioprocessos que envolvam fungos filamentosos e a produção de enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos (POSCH, HERWING; SPADIUT, 2013).

As enzimas possuem elevado grau de especificidade por seus substratos, acelerando reações químicas específicas. As enzimas têm se convertido em ferramentas importantes, não apenas na medicina como também na indústria química, alimentícia e farmacêutica (HSIAO *et al.*, 2014). A ausência de enzimas específicas em um processo pode fracassar o crescimento do fungo em um substrato, possivelmente pela sua incapacidade de digerir-lo (ANDRADE, 2013).

O mercado mundial de enzimas industriais está estimado em torno de 1,7 a 2,0 bilhões de dólares e acredita-se que a comercialização mundial dessas substâncias movimente aproximadamente 225 milhões de dólares anualmente (SATYANARAYANA, RAO; EZHILVAUNAN *et al.*, 2006). Em 2010 o mercado mundial de enzimas foi estimado em 3,3 bilhões de dólares podendo chegar em 4,4 bilhões em 2015 (SANATAN *et al.*, 2013).

Por exemplo, existe grande variedade de micro-organismos que produzem *celulases*, entretanto apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Tais fungos são decompositores e podem ser encontrados no solo, colonizando vegetais, suas raízes e resíduos, bem como atuar como simbiontes (AGUIAR; MENEZES, 2000).

De acordo com Guimarães (2009), como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias necessárias para o seu metabolismo na natureza, principalmente, macromoléculas insolúveis que precisam ser primeiramente degradadas em unidades monoméricas menores e liquefeitas antes de sua assimilação. Compostos de grande peso molecular, como polissacarídeos não podem ser incorporados diretamente sem antes terem sido reduzidos. As hifas fúngicas têm pequenos volumes, mas grandes áreas superficiais, as quais aumentam a capacidade de absorção (Van LEEUWEN *et al.*, 2012).

Esposito e Azevedo (2004) explicaram que em relação ao metabolismo geral dos fungos, o carbono é o mais importante dentre os macronutrientes necessários, pois integra a composição elementar da biomassa dos mesmos. Há muitos compostos de carbono que podem ser utilizados pelos fungos, como glicose, maltose, sacarose, frutose, dentre outros.

Sendo a glicose (hexose) a fonte preferencial de carbono para obtenção de energia dos mesmos (VAULONT; VASSEUR; KAHAN, 2000). Esses carboidratos entram na célula por difusão facilitada, (sem gasto de energia), utilizando carreadores específicos para hexoses com afinidade específica para cada tipo de açúcar (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Outro macroelemento importante é o nitrogênio, constituinte essencial do tecido fúngico, estando presente em todas as moléculas de aminoácidos e consequentemente nas proteínas. Fontes de nitrogênio são requeridas para a síntese de aminoácidos, vitaminas, purinas e pirimidinas dos ácidos nucléicos e para síntese de glicosamina para montagem de quitina (polímero que é o principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados e da parede celular fungica) (TRABULSI, 2005).

Segundo Griffin (1994), determinados elementos presentes no meio são indispensáveis para o crescimento dos fungos, tais como: micronutrientes, em concentrações iguais ou inferiores a  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>, e macronutrientes, em concentrações em torno de  $10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Entre os macroelementos estão: carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio e cálcio, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tanto os substratos naturais como os substratos sintéticos e semi-sintéticos utilizados no cultivo de fungos deve conter uma fonte de nitrogênio, no entanto observa-se que os fungos apresentam diferenças na habilidade para a utilização das diversas fontes de nitrogênio. Na composição elementar de uma célula fúngica, o nitrogênio corresponde, aproximadamente, 12% a 16% da matéria seca da biomassa, não existindo fungos capazes fixar o N<sub>2</sub>, estando essa capacidade restrita a apenas às bactérias (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Dependendo da espécie do fungo, o nitrogênio pode ser obtido nas formas de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou nitrogênio orgânico (N<sub>2</sub>). A maioria dos fungos usa nitrato que é reduzido a nitrito com mediação da enzima nitrato redutase e depois a amônia. Das várias formas de nitrogênio encontradas na natureza, os micro-organismos assimilam mais facilmente a amônia. Porém, micro-organismos que possuem enzimas nitrato redutase e nitrito redutase apresentam a capacidade de assimilar, respectivamente, nitrato ou nitrito, reduzindo nitrato à nitrito, e nitrito à amônia (PUTZKE; PUTZKE, 2002).

Tabela 3 - Elementos químicos necessários para o metabolismo fúngico.

| Elemento                | Fontes                             | Funções Celulares                                                                        |
|-------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Macronutrientes:</b> |                                    |                                                                                          |
| Carbono                 | Açúcares                           | Elemento estrutural de célula fúngica em combinação com o hidrogênio e fonte de energia. |
| Hidrogênio              | Prótons                            | Próton transmembranar vital para o transporte de nutrientes na célula.                   |
| Oxigênio                | Ar, O <sub>2</sub>                 | Substrato para a respiração e outras enzimas oxidativas.                                 |
| Nitrogênio              | Sais de amônia, uréia, aminoácidos | Participação na estrutura e formação de proteínas, aminoácidos e enzimas.                |
| Fósforo                 | Fosfatos                           | Formação de ácidos nucléicos e membranas celulares.                                      |
| Enxofre                 | Sulfatos e metionina               | Formação de aminoácidos e vitaminas.                                                     |
| Potássio                | Sais de K <sup>+</sup>             | Atividade enzimática e balanço iônico.                                                   |
| Magnésio                | Sais de Mg <sup>2+</sup>           | Atividade enzimática e estrutura celular.                                                |
| Cálcio                  | Sais de Ca <sup>2+</sup>           | Processo de transdução.                                                                  |
| <b>Micronutrientes:</b> |                                    |                                                                                          |
| Cobre                   | Sais cúpricos                      | Pigmento redox.                                                                          |
| Ferro                   | Sais férricos                      | Hemeproteínas e citocromos.                                                              |
| Manganês                | Sais de Mn <sup>2+</sup>           | Atividade enzimática.                                                                    |
| Molibdênio              | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>   | Metabolismo do nitrato e vitamina B12.                                                   |
| Zinco                   | Sais de Zn <sup>2+</sup>           | Atividade enzimática.                                                                    |

Fonte: Adaptado de Kavanagh (2005).

### 3.4.3 Biodegradação Fúngica

Biodegradação é o processo no qual diferentes tipos de micro-organismos podem converter uma molécula complexa em moléculas simples. Alguns usam moléculas de carbono como fonte para obtenção de energia necessária para crescer e manutenção de seu metabolismo (SOLÍS *et al.*, 2012).

Entre os micro-organismos, os fungos são potenciais candidatos para a biocatálise e detoxificação de poluentes químicos. Sua habilidade de estender uma rede micelial, a baixa especificidade catalítica de suas enzimas e efetiva capacidade de crescer em ambientes com baixas concentrações de nutriente, são as características metabólicas que os tornam bons candidatos para utilização como agentes detoxificantes (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011).

Os fungos filamentosos têm sido bastante estudados em biodegradação de vários compostos como corantes por exemplo. Esses seres são abundantes no meio ambiente e capazes de adaptar rapidamente o seu metabolismo sob diferentes fontes de carbono e nitrogênio para sobreviverem (GOMI *et al.*, 2011). Esse crescimento se deve em virtude do alto potencial degradativo, bioassortivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas (BENNET, 1998).

Outro exemplo é em relação aos fungos lignolíticos, os organismos mais eficientes na biodegradação de materiais lignocelulósicos na natureza são os fungos de decomposição branca que degradam todos os componentes da madeira e possuem sistemas capazes de degradar a lignina com eficiência; e os de decomposição parda que degradam principalmente polissacarídeos (HATAKKA, 1994).

O interesse na pesquisa de enzimas lignocelulolíticas secretadas extracelularmente por esses fungos, fundamenta-se na utilização destas na reciclagem de resíduos da agricultura e/ou rejeitos urbanos (VASSILEV; BACA; VASSILEVA, 1994) e também no tratamento de solos e efluentes diversos (DURÁN; ESPOSITO, 2000). Estas enzimas possuem vantagens na remediação de diversos tipos de contaminantes, por não possuírem alta especificidade com os substratos, uma vez que a estrutura da lignina apresenta diversos modelos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005).

A utilização do termo biodegradação nesse caso refere-se não só a completa decomposição da lignina em CO<sub>2</sub> e água, bem como às diversas modificações ou bioalterações produzidas na molécula. O crescimento desses fungos diminui em condições de carência de nitrogênio e de carbono, e as atividades ligninolíticas aparecem como uma forma metabólica secundária (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Diversas pesquisas demonstram o potencial de utilização de fungos em processo de biodegração de poluentes diversos, como os exemplificados a seguir.

Pinto *et al.* (2012) avaliaram a degradação dos pesticidas terbutilazina, difenoconazol e pendimetalin por cultura de fungos. Os fungos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus oryzae*, *Lentinula edodes*, *Penicillium brevicompactum* e *Lecanicillium saksenae*

criaram em um meio contendo solução de Vishiniac, nutrientes, glicose e extrato de levedura e a remoção dos pesticidas ocorreu nas primeiras horas de exposição. Os produtos foram removidos, na seguinte ordem de eficiência, por todos os fungos estudados pendimetalin > difenoconazol > terbutilazina.

Entretanto, o fungo lignolítico *Phanerochaete chrysosporium*, do filo basidiomicota, tem sido amplamente estudado pela capacidade de biodegradação e descoloração de efluentes têxteis, por apresentar disposição em degradar lignina em altas taxas, através de mineralização ou deslignificação seletiva ou não seletiva, produzindo dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), água (H<sub>2</sub>O) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MARINHO; RODRIGUES, 2012).

Espécies de fungos filamentosos demonstraram aplicação na biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Mucor racemosus* apresentou significativos níveis de degradação para benzopireno enquanto *Aspergillus sclerotiorum* demonstrou capacidade de depleção para o mesmo composto e adicionalmente para pireno (PASSARINI, 2011).

Nos estudos de Xiao *et al.* (2011) a biodegradação do pesticida organoclorado clordano por fungos das espécies *Phlebia lindtneri*, *Phlebia brevispora* e *Phlebia aurea*, os autores declararam ser este o primeiro relato de transformação oxiclordano por micro-organismos e que as espécies *Phlebia* têm atividade específica para a biotransformação de compostos organoclorados, pois estas espécies utilizaram inibidores do citocromo P450 no estudo sendo os resultados dos experimentos consistentes referindo-se ao envolvimento de citocromo P450 mono-oxigenase em alguns passos do metabolismo clordano, especialmente nas epoxidação e processo de hidroxilação.

A biodegradação dos efluentes de indústrias de óleos vegetais através de fungos filamentosos com atividade lignolítica foi analisada demonstrando resultados animadores. Alguns dos resíduos encontrados nestes efluentes são potencialmente danosos ao meio ambiente e requerem altos investimentos para seu tratamento usual (MOHAMMAD *et al.*, 2012).

Andrade (2013) estudou a habilidade do fungo da podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, em degradar o corante vermelho de congo em um meio enriquecido com glicose ou farelo de trigo como cossubstratos e verificou que a glicose foi mais eficiente na degradação do corante, chegando a um percentual de remoção de 97%, enquanto que o farelo de trigo não obteve remoção satisfatoriamente efetiva.

### 3.4.4 Viabilidade de esporos e quebra de dormência

Em estudo feito por Freitas, Cely e Andrade (2014), com o objetivo de avaliar a influência do pH e temperatura na germinação do fungo micorrízico arbuscular, *Acaulospora* sp, foi observado que, na primeira condição estabelecida para a quebra de dormência, os esporos foram mantidos em temperatura de 4 °C. Aqueles que foram extraídos depois de serem armazenados por uma semana em temperatura baixa, apresentaram taxa de germinação maior comparada aos esporos que foram extraídos após 31 dias. Outra observação feita pelos autores foi que o tempo médio de germinação dos esporos tornou-se maior quando os esporos usados como inóculo foram expostos a um tempo de congelamento mais prolongado, pois temperaturas muito baixas, como as observadas no congelamento, reduzem o tempo de germinação, sendo que para 77 dias de manutenção do inóculo a -4 °C, a germinação era nula, com a maior parte dos esporos apresentando-se inviável.

A produção de esporos inviáveis pelo uso da técnica de congelamento na manutenção do inóculo também é relatada por outros autores, como Sola *et al.* (2012), Romeiro (2006).

Segundo Romeiro (2006) o congelamento sucessivo por período longo de tempo pode acarretar na redução da viabilidade de esporos de micro-organismos, em função dos danos causados às células decorrentes da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada, frequentemente, entre -4°C e -20 °C.

Em outro trabalho, Silva, Costa e Reche (2008) avaliaram a viabilidade de esporos de leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla* em caldo cérebro-coração contendo glicerol, tendo os esporos sido mantidos sob refrigeração por sete dias, após procedimento de recuperação e antes serem congelados a -20°C. Os autores observaram que após três anos de congelamento houve recuperação de 99% das leveduras, porém, no ano seguinte, notaram redução de viabilidade das culturas com 90,6% de recuperação (144 leveduras).

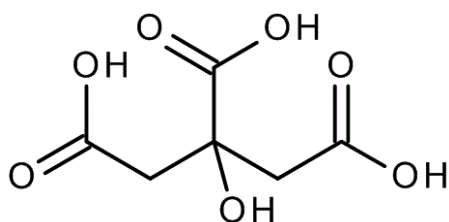
Além disso, a presença de cianeto como componente natural da manipueira deve ter também exercido efeito negativo sobre a germinação dos esporos, aumentando a inviabilidade do processo quanto à produção de biomassa, uma vez que na presença de metais pesados e outros compostos tóxicos pode ocorrer o atrofiamento de estruturas reprodutivas, reduzindo inclusive o número de esporos, como foi reportado por Mukherjee *et al.* (2010) que estudaram o efeito do arsenato sobre o crescimento de *Aspergillus niger*.

De acordo com Mukherjee *et al.* (2010), na presença de 25 mg.L<sup>-1</sup> de arsênico houve crescimento de biomassa de *Aspergillus niger* em após 96 h de inoculação, sendo que esta foi drasticamente reduzida quando o fungo foi exposto a concentrações de 50, 75 e 100 mgL<sup>-1</sup> de arsenato, não tendo ocorrido crescimento quando a concentração de arsenato era de 106 mgL<sup>-1</sup>.

### 3.5 Ácido cítrico

O ácido cítrico é um ácido orgânico tricarboxílico presente na maioria das frutas, sobretudo em cítricos como o limão e a laranja (WEIL, 2004). Sua fórmula química é C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> e sua fórmula estrutural está representada na Figura 6. O ácido cítrico é utilizado em vários segmentos industriais: cerca de 70% é usado pela indústria de alimentos e bebidas, 12% pela indústria farmacêutica e 18% por outras indústrias (BOLING-FRANKENBACH *et al.*, 2001; TSILOYIANNIS *et al.*, 2001).

Figura 6 - Fórmula estrutural do ácido cítrico.



Fonte: Shore (2002).

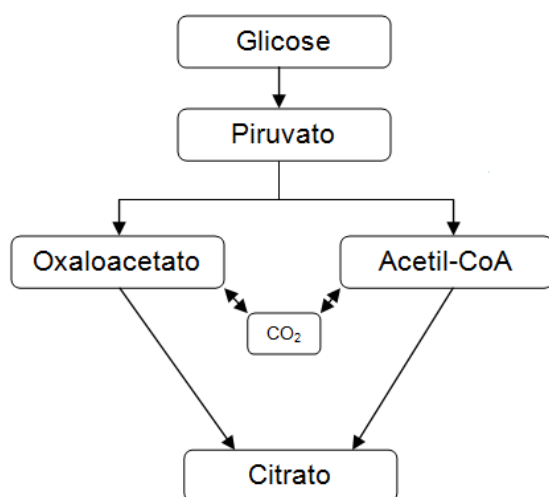
A acidez do ácido cítrico é devida aos três grupos carboxilas -COOH que perdem um próton em soluções, formando um íon citrato. Estes formam sais denominados citratos com íons metálicos. O citrato de cálcio ou "sal amargo" é um importante citrato, utilizado geralmente na preservação e condimentação dos alimentos (WEIL, 2004).

Os passos metabólicos para a biossíntese de lípidos a ácido cítrico são os mesmos em relação à glicose. Porém, uma porção glicerol realiza a síntese de hexose e da pentose respectivamente, que são necessários para a biossíntese do ácido nucléico e geração do NADPH<sub>2</sub>. A síntese de hexoses é realizada através da gliconeogênese, onde o glicerol sofre a inversão do fluxo de carbono a partir de gliceraldeído (ANDREA *et al.*, 2010).

Bioquimicamente, por via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico é possível simplificar a biossíntese básica do ácido cítrico a partir da glicose. A Figura 7 demonstra a

glicólise gerando piruvato e acetil-CoA através da quebra da glicose, a formação de oxaloacetato a partir do piruvato e  $\text{CO}_2$  e o acúmulo do ácido cítrico no ciclo de Krebs.

Figura 7- Esquema simplificado da glicólise para acúmulo de ácido cítrico no Ciclo de Krebs.



Fonte: Adaptado de Cremonese (2012).

No século VIII, já se conhecia a natureza ácida dos sucos de lima e limão. Porém, somente em 1784 este ácido foi isolado pelo químico Carl Wilhem Scheele, cristalizando-o a partir do suco de limão (ANDRADE, 2009). Na Itália houve início a produção industrial do ácido cítrico, por meio da purificação de frutas cítricas até o desenvolvimento da produção pelo processo microbiológico utilizando o fungo *A. níger*. Este novo processo barateou a produção de ácido cítrico (KOLICHESKI; SOCCOL, 1995).

A produção em 2011 de ácido cítrico ultrapassou as 1,8 milhões de toneladas e verifica-se que por ano existe um aumento de cerca de 4% da produção de ácido cítrico a nível mundial (NADEEM ET AL., 2014; SOCCOL; VANDENBERGHE; RODRIGUES, 2006). Existem muitos fungos produtores de ácido cítrico: *Penicillium citrinum*, *Mucor piriformis*, *Ustilina vulgaris*, *Penicillium luteum*, *Aspergillus clavatus*. São de interesse industrial as que permitem altos rendimentos de produção de ácido cítrico, entre estes os fungos do gênero *Aspergillus* são muito empregados para este propósito (LIMA et al., 2001).

Segundo Coldebela (2009), praticamente todo o ácido cítrico produzido mundialmente é produzido por algum tipo de processo de fermentação, sendo eles:

- Processo Koji: no qual o substrato é sólido, sendo utilizada uma linhagem específica de *Aspergillus niger*;

- Processo de fermentação em superfície: o micélio do fungo (*A. niger*) que cresce sobre a superfície do meio de cultura estático, sendo o produto da fermentação recolhido do meio;
- Processo de fermentação por cultura submersa: o fungo se desenvolve inteiramente submerso no meio de cultura líquido sob agitação (assegurando a homogeneidade tanto da distribuição dos microrganismos quanto dos nutrientes).

Por sua natureza inócua, o ácido cítrico apresenta várias aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Comercialmente é obtido a partir de fermentações submersas com *Aspergillus niger* (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). A literatura revela que, embora haja variação em relação ao organismo e às condições de cultivo, a produção do ácido cítrico inicia-se entre 80 e 120 horas de cultivo (idíofase) (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013).

Várias cepas de *A. niger* são aplicadas em grande escala na produção industrial de ácido cítrico (também conhecido como aditivo alimentar E330) e ácido glucônico (E574), que servem como ingredientes para a produção de diversos alimentos e bebidas (KAAIJ, 2007). A maior parte da produção mundial do ácido cítrico é a partir da fermentação da sacarose por esse fungo (ROCHA, 2009). Segundo Prata e Santos (2005), baixas concentrações de açúcares no meio fermentativo provocam baixos rendimentos na produção de ácido cítrico.

A preparação do ácido cítrico envolve várias fases como a fermentação aeróbica da sacarose pelo *Aspergillus* e posterior separação do ácido cítrico por precipitação com a utilização de hidróxido de cálcio e, por fim, a adição de ácido sulfúrico para que seja feita a decomposição do fungo. Após a eliminação de impurezas por carvão ativado e posterior secagem, o produto pode ser embalado para ser comercializado (PASTORE; HASAN; ZEMPULSKI, 2011).

Em fermentação submersa a faixa ótima de concentração de sacarose é 10 a 14%, sendo que abaixo de 2,5% não há produção de ácido cítrico (XU *et al.*, 1989 *apud* PASTORE; HASAN; ZEMPULSKI, 2011). Segundo Penna (2001), as baixas concentrações de açúcares facilitam o acúmulo de ácido oxálico, e, conseqüentemente, diminuem a produção de ácido cítrico.

Outros estudos relatam que diversos fatores como composição do meio, tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio e presença de elementos traço influenciam a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (GOSH, 2013; AUTA *et al.*, 2014).

Assim, uma grande variedade de substratos vem sendo testada para se avaliar a sua eficiência e eficácia na estimulação da produção do ácido cítrico. Resíduos de frutas,

resíduos de cervejaria, dentre outros resíduos e subprodutos agroindustriais, foram avaliados em relação à produção do ácido cítrico, apresentando resultados positivos em diversas condições experimentais (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013; AUTA *et al.*, 2014).

Em relação à utilização de manipueira como substrato para a biossíntese de ácido cítrico, teve seu primeiro estudo por Cabello e Cereda (1989) que constataram sua potencialidade. Posteriormente, Cabello (1991) verificou a evolução da produção deste ácido através de fermentação submersa, monitorada por computador, e observou a viabilidade do uso da manipueira recém-coletada, enriquecida com sacarose, como substrato para a biossíntese de ácido cítrico.

Em estudo de Leonel e Cereda 1995, no qual os autores realizaram ensaio comparando a produção de ácido cítrico em meio sintético de Prescott e Dunn e em meio elaborado com manipueira por *A. niger*, obteve uma produção de 2,5 e 2,8 g.L<sup>-1</sup>, após um período de incubação de 7 dias, com pH inicial ajustado a 2, no entanto os autores observaram baixo crescimento do fungo, e consequentemente baixo acúmulo de ácido cítrico no meio, acusando que o não crescimento do micro-organismo se deva ao alto teor de cianeto, maior que 70 mg/L da manipueira utilizada por eles. Contudo segundo Papagianni (2007), valores de pH baixo inibem a produção de ácidos orgânicos indesejáveis (ácido glucônico e ácido oxálico), tornando a recuperação de ácido cítrico mais simples a partir do meio de fermentação.

Já em estudo realizado por Pastore, Hasan e Zempulski (2011), ao realizar experimento com *A. niger* e meio com manipueira obtiveram o alto acúmulo de ácido cítrico o que foi justificado pelo teor inicial de cianeto de 0,4 mg/mL e um pH inicial entre 6 e 8, o qual não foi ajustado e nem tamponado, facilitando o desenvolvimento do micro-organismo. A produção de ácido cítrico apresentada por Leonel e Cereda (1995) refere-se ao valor obtido após 7 dias de fermentação, diferente deste trabalho, em que a produção de ácido cítrico foi avaliada a cada 24 h por um período de 6 dias, indicando que não é necessário um longo período de fermentação para a produção de ácido cítrico, já que os melhores resultados foram obtidos no primeiro dia de fermentação.

Dadas as diferentes características climáticas presentes no país, que culmina em diferenças morfológicas da *Manihot esculenta* Crantz e consequentemente da manipueira, e, bem como aos trabalhos sobre manipueira serem antigos e escassos, e ainda da ausência de artigos sobre a manipueira oriunda de mandiocas plantadas no Ceará, fez-se necessário este estudo sobre este resíduo oriundo da variedade mais comumente encontrada no Ceará como meio de cultura para o *Aspergillus niger* AN 400 a fim de produzir ácido cítrico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico serão demonstrados os materiais e as metodologias utilizadas neste trabalho, iniciando pela coleta da mandioca e extração da manipueira com a sua devida caracterização. Serão abordados ainda os testes de toxicidade (Etapa I) da manipueira ao fungo, com a sua posterior adaptação para a produção da suspensão de esporos.

Será discutida também a metodologia que abrange as etapas II e III, que falam respectivamente sobre a operação de reatores em bateladas com biomassa fúngica dispersa e sobre a operação em reator em batelada sequencial com biomassa fúngica imobilizada.

Por fim serão detalhadas as análises espectrofotométricas para a determinação de ácido cítrico, cianeto livre e açúcar redutor além da estimativa de parâmetros cinéticos aparentes do decaimento de DQO e de cianeto.

### 4.1 Coleta da mandioca e extração da manipueira

A mandioca utilizada para a extração da manipueira foi coleta no Centro de Ensino e Treinamento em Extensão (CETREX) que fica localizado em Caucaia-CE-BR, onde se mantém o cultivo de algumas variedades da espécie *Manihot esculenta*. A variedade escolhida para o experimento foi a popularmente conhecida por mandioca paraense. Na Figura 8 é apresentada a área interna do CETREX (Figura 8a), bem como a coleção de cultivares de mandioca (Figura 8b).

Figura 8- (a) CETREX; (b) Cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).



Fonte: Autor (2015).

Inicialmente, a mandioca foi coletada (Figura 9a) e realizada a lavagem para a retirada de terra. Após pesagem, a mesma foi ralada, espremida e coada, a fim de separar o

bagaço (Figura 9b) da manipueira (Figura 9c), tendo-se obtido para 1 kg de mandioca processada, aproximadamente, 500 mL de manipueira.

Figura 9- (a) Coleta das mandiocas; (b) Bagaço; (c) Manipueira extraída.



Fonte: Autor (2015).

## 4.2 Caracterização da manipueira

Nesta caracterização foram realizadas as análises de DQO (filtrada), pH, amônia, nitrato, nitrito e sólidos totais, determinadas conforme APHA (2005); açúcar redutor, baseado no método fenol-sulfúrico, de acordo com Dubois *et al.* (1956); e o teor de cianeto conforme Neves *et. al* (2014) adaptado de Epstein (1947).

## 4.3 Etapa I – Teste de toxicidade

O micro-organismo utilizado nesta e nas demais etapas do trabalho foi o fungo *Aspergillus niger* AN 400, obtido no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) do Instituto Federal do Ceará (IFCE).

A fim de determinar a toxicidade da manipueira ao fungo, utilizaram-se placas de Petri esterilizadas que receberam de 10 mL de meio PDA (agar batata dextrose), diluído em manipueira 100% concentrada – placa controle – e ainda em diferentes concentrações de manipueira em água destilada nas concentrações de 5%, 10%, 25%, 50%, 70% e 100%.

A suspensão de esporos foi inoculada em cada uma das placas, na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, com exceção dos brancos, placas que continham apenas o meio PDA.

Os testes foram realizados em triplicata, em estufa microbiológica, da marca Biopar, a 30°C, durante período de crescimento de 12 dias para verificação da esporulação na

superfície das placas. Os meios foram previamente esterilizados a 121°C, sob pressão entre 1 e 1,5 kgf.cm<sup>2</sup>, durante 20 minutos, em autoclave (marca Prismatec).

#### 4.4 Adaptação do micro-organismo à manipueira

O procedimento de adaptação dos fungos à manipueira foi feito acondicionando-se em erlenmeyers de 250 mL, esporos de *A. niger* AN 400 na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, e 50 mL de manipueira, a qual foi introduzida na forma concentrada (100% v/v) e na forma diluída: 0,5%, 1%, 5%, 20%, 30%, 50% e 80% (v/v).

Para que se verificasse uma possível interferência por micro-organismos presentes na manipueira extraída, foram montados dois grupos de reatores: um com meio não esterilizado (NE) e outro contendo meio esterilizado (E) (Figura 12).

O meio do grupo (E) foi previamente esterilizados a 121°C, sob pressão entre 1 e 1,5 Kgf.cm<sup>2</sup>, durante 20 minutos, em autoclave (marca Prismatec). A vantagem de esterilizar seria a de evitar possíveis competidores ao fungo *Aspergillus niger*.

Em ambos os grupos, o meio foi acrescido de 10% em peso de sacarose, concentração esta baseada no trabalho de Leonel e Cereda (1995) que utilizaram manipueira e *A. niger* para a produção de ácido cítrico.

Os reatores foram submetidos à agitação de 120 rpm, em mesa agitadora orbital da marca Cientec (Figura 10), sob temperatura de 30°C ± 2°C, por período de 14 dias.

Figura 10- Produção de inóculo adaptado a partir de cultivo em manipueira, em meio não esterilizado (NE) e esterilizado (E), nas concentrações de 0,5%, 1%, 5%, 20%, 30%, 50%, 80% e 100% v/v.



Fonte: Autor (2015).

Além da sacarose, todos os reatores receberam adição de uréia, peptona e sulfato de amônia na concentração de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  cada um, e ainda de  $1 \text{ mL.L}^{-1}$  de solução de micronutrientes Vishniac, cuja constituição está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição química da Solução de Vishniac.

| <b>Produto químico</b>                                              | <b><math>\text{g.L}^{-1}</math> de solução</b> |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| EDTA                                                                | 10,0                                           |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                           | 4,40                                           |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$                           | 1,00                                           |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$                          | 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                                           |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$                           | 1,00                                           |

Fonte: Sampaio (2005).

#### 4.5 Produção da suspensão de esporos

Nesta etapa ocorreu a retirada dos esporos dos reatores com maior grau de esporulação oriundos da etapa de adaptação do fungo à manipueira (item 4.4).

Os esporos oriundos do frasco em que houve a maior esporulação foram semeados em placas de Petri, contendo meio ágar-manipueira, o qual foi obtido dissolvendo meio PDA em manipueira, diluída a 80 % v/v, em água, conforme Leonel e Cereda (1995).

A semeadura nas placas ocorreu com auxílio de alça de platina, e estas foram levadas para estufa microbiológica (marca Biopar), onde permaneceram a  $30^\circ\text{C}$ , por 14 dias, para crescimento das colônias fúngica. Após este período, os esporos foram removidos, com 5 mL de solução Tween, a fim de facilitar o desprendimento dos mesmos com o auxílio de alça de Drigalski.

Com pipeta automática, a suspensão de esporos foi então transferida para frasco âmbar que após a contagem dos esporos manteve-se sob refrigeração, a  $4^\circ\text{C}$ .

O procedimento de contagem de esporos foi baseado em Sampaio (2005), retirando-se 50  $\mu\text{L}$  da suspensão armazenada e transferindo esse volume para um frasco, adicionando-se ainda 950  $\mu\text{L}$  de solução salina. Essa mistura foi então homogeneizada em agitador vórtex.

Uma alíquota de 20 µL do conteúdo presente no tubo foi posteriormente colocado em uma câmara de Neubauer e com auxílio do microscópio óptico (marca Bioval), com aumento de 400 vezes, onde foi realizada a contagem direta dos esporos. Para determinação da concentração de esporos foi utilizada a Equação 1.

$$C = N \cdot F \cdot V_{cam} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

C : Concentração inicial de esporos (esporos mL<sup>-1</sup>);

N : número de esporos obtidos na contagem;

F : fator de diluição;

V<sub>cam</sub> : volume total da câmara (2,5 x 10<sup>5</sup> mL)

#### **4.6 Etapa II - Operação em reatores em bateladas com biomassa fúngica dispersa.**

Nesta etapa do experimento foram utilizados 25 reatores de 250 mL de volume total e 150 mL de volume útil, os quais foram agrupados em função da fonte de nitrogênio, da adição de sacarose e inóculo, constituindo 5 grupos de reatores, cada qual com 5 reatores. (Tabela 5)

Em cada grupo, os reatores foram operados em função dos tempos reacionais (TR) de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 168 h, de modo que ao atingirem o tempo reacional definido, cada reator era removido da batelada.

Todos os reatores receberam vedação com tampas fabricadas em papel alumínio, lacradas com elástico, a fim de minimizar contaminação, sendo previamente esterilizados em autoclave (marca Primatec) a 121°C, sob pressão entre 1 e 1,5 kgf.cm<sup>2</sup>, durante 20 minutos. O experimento foi conduzido em mesa agitadora, na qual os reatores foram mantidos sob agitação de 120 rpm e a temperatura de 30°C ± 2, ao longo de 7 dias (Figura 11).

Figura 11– (a) Reatores autoclavados; (b) Reatores em operação.



Fonte: Autor (2015).

A concentração fúngica de *A. niger* AN 400 utilizada foi de  $2 \times 10^6$  esporos. mL<sup>-1</sup>. Como fontes de nitrogênio foram colocadas em conjunto: uréia, peptona e sulfato de amônia na proporção de 5 g.L<sup>-1</sup>, cada, a mesma usada por Pastore, Hasan e Zempulski (2011), que obtiveram as maiores produções de ácido cítrico com essas concentrações. A concentração de sacarose acrescida foi de 100 g.L<sup>-1</sup>, mesma aplicada por Leonel e Cereda (1995) e por Pastore, Hasan e Zempulski (2011), enquanto que a solução de Vishiniac foi empregada na proporção de 1 mL.L<sup>-1</sup>.

Já a diluição da manipueira utilizada nos reatores foi feita com base na melhor resposta de esporulação observada no ensaio de adaptação (item 4.4). A organização operacional dos reatores está descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Organização experimental dos grupos de reatores com biomassa dispersa.

|             | Fungo | Manipueira | Sacarose<br>10% | Fontes de<br>Nitrogênio | Solução de<br>Vishiniac |
|-------------|-------|------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>RC</b>   |       | X          |                 |                         |                         |
| <b>RFS</b>  | X     | X          | X               |                         | X                       |
| <b>RFSN</b> | X     | X          | X               | X                       | X                       |
| <b>RF</b>   | X     | X          |                 |                         | X                       |
| <b>RFN</b>  | X     | X          |                 | X                       | X                       |

**RC** – Reator Controle com Manipueira; **RFS** - Reator com Fungo, Sacarose e Manipueira; **RFSN** - Reator com Fungo, Sacarose, Fontes de Nitrogênio e Manipueira; **RF** - Reator com Fungo e Manipueira; **RFN** - Reator com Fungo, Fontes de Nitrogênio e Manipueira.

Fonte: Autor (2015).

As análises realizadas nesta etapa foram: DQO (filtrada) e pH, executadas de acordo com APHA (2005); ácido cítrico, por método espectrofotométrico, segundo Marier e Boulet (1958) e cianeto livre descrito por Neves *et al.* (2014), adaptado de Epstein (1947).

#### **4.7 Etapa III - Operação em reator em batelada sequencial (RBS) com biomassa fúngica imobilizada.**

O meio suporte utilizado na imobilização dos micro-organismos foi espuma de poliuretano cortada em cubos de 1 cm de aresta, totalizando 15 g. Este material foi esterilizado em autoclave, da marca Primatec, a 121°C, sob pressão entre 1 e 1,5 kgf.cm<sup>2</sup>, durante 15 minutos.

Depois de realizada a esterilização, os cubos de poliuretano foram então acondicionados em três redes de polietileno dentro do reator, confeccionado em vidro, com capacidade de 5 L. O reator recebeu 4 L de manipueira diluída com base na melhor resposta de esporulação observada no ensaio de adaptação (item 4.4) e esterilizada, adicionado de frações de uréia, peptona e sulfato de amônia na concentração de 5 g.L<sup>-1</sup>, cada, além de 1 mL.L<sup>-1</sup> de solução de Vishiniac.

Em seguida, realizou-se a adição do inóculo na forma de suspensão de esporos de *Aspergillus niger* AN400 na concentração 2 x 10<sup>6</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>. O reator foi aerado por mini-compressores, com capacidade de 50 L.h<sup>-1</sup> e potência de 5 W, difundida para o meio por pedras porosas.

Foram realizados 4 ciclos operacionais com TR de 48 h, sendo que, no início de cada ciclo, o reator era alimentado com a manipueira nas mesmas condições citadas anteriormente. Na Figura 12 está mostrado o RBS em uso.

Figura 12 – RBS com biomassa fúngica imobilizada.



Fonte: Autor (2015).

Ao longo dos ciclos de 48 h, foram retiradas alíquotas para realização de análises, na caracterização de entrada e em tempos de reação (TR) intermediários de: 2 h, 5 h, 8 h, 24 h, 26 h, 29 h, 31 h e 48 h. Foram realizadas as mesmas análises da etapa II, sendo que pH e ácido cítrico foram determinados no início e ao final do TR de 48 h; enquanto que DQO (filtrada) e cianeto foram determinados na caracterização de entrada e nos TRs de 2 h, 5 h, 8 h, 24 h, 26 h, 29 h, 31 h e 48 h.

## **4.8 Análises Espectrofotométricas**

### **4.8.1 Determinação de ácido cítrico**

A determinação de ácido cítrico foi realizada segundo o método espectrofotométrico adaptado de Saffran e Denstedt (1948), no qual juntou-se à amostra, anidrido acético e piridina. Para a curva padrão foi usada solução mãe de ácido cítrico, dissolvendo 50 g de ácido cítrico em 1000 mL de água destilada.

A análise consistiu em adicionar em um tubo, 1 mL da amostra a ser analisada, incluindo o branco (com água destilada), mais 1,3 mL de piridina e em seguida adicionar 5,7 mL de anidrido acético. Os tubos foram fechados imediatamente com rolhas de plástico e, em seguida, colocados em banho-maria a 32°C por 30 minutos.

Após este período foi realizada a leitura em espectrofotômetro (marca Thermo Scientific), em comprimento de onda de 420 nm. O branco foi preparado com 1 mL de ácido tricloroacético, seguindo o mesmo procedimento dos demais tubos. A curva padrão foi construída utilizando-se diluições da solução mãe de ácido cítrico com concentração variando de 25 mg.mL<sup>-1</sup> a 200 mg.mL<sup>-1</sup>.

### **4.8.2 Determinação do cianeto livre**

Para a determinação do cianeto livre (CN<sup>-</sup>), foi utilizado método espectrofotométrico descrito por Neves *et al.* (2014) adaptado de Epstein (1947). O método consistiu na filtragem da manipueira por filtro de filtragem rápida, com auxílio de um funil de Gooch, cujo filtrado (0,1mL) foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se 3 mL de tampão fosfato (pH 6) e 0,3 mL de cloroamina T, colocando-se em banho de gelo por 5 minutos.

Após esse período, foi realizada a adição de 2 mL de reagente de cor (piridina/ácido clorídrico/ácido barbitúrico), agitando-se a solução e deixando os balões em repouso por 10 minutos. Avolumou-se, então, a solução com água destilada e deionizada e, após cinco minutos, realizou-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro de absorção molecular, em comprimento de onda de 578nm, confrontando os resultados com uma curva de calibração, determinada no momento da leitura das amostras, utilizando-se como padrão uma solução de cianeto de sódio (NaCN) 250 mg dm<sup>-3</sup>. Os resultados de absorbância encontrados foram convertidos para concentração realizando-se os devidos cálculos.

Para o preparo do reagente de cor, 15 g de ácido barbitúrico foram colocados em um béquer de 1L, adicionando-se 100 mL de água deionizada para lavagem das paredes do béquer. Adicionou-se 75 mL de piridina e agitou-se a solução, acrescentando-se, posteriormente, 15 mL de HCl concentrado, procedendo-se à agitação da mistura até que todo ácido barbitúrico fosse dissolvido e, então, avolumado em um balão de 1L.

#### **4.8.3 Quantificação de açúcar redutor**

Foi determinada a concentração de açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados, incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequentemente complexação dos produtos formados com fenol.

As análises foram feitas de acordo com Dubois (1956), cujo método consistiu na adição, em tubo de tampa rosqueda, de 0,5 mL de amostra e 0,5mL de solução de fenol, sendo imediatamente adicionado 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi levada ao banho-maria a 28°C por cerca de 15 minutos. Os teores de açúcares redutores foram então determinados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 490 nm, utilizando-se uma curva padrão da solução de fenol.

A mudança de cor da solução é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra. A reação é sensível e de cor estável.

#### **4.9 Estimativa de parâmetros cinéticos aparentes**

A cinética de decaimento de DQO e de cianeto foi determinada usando o programa Microcal Origin 7.5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida

plotando-se na ordenada as concentrações da amostra ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) ou do controle e na abcissa, o tempo de reação (TR).

#### **4.10 Teste de adsorção do cianeto ao meio suporte**

Neste ensaio foi utilizado reator de vidro de 5L, ao qual foram adicionados 5 g de cubos de poliuretano acondicionados em redes de polietileno previamente secos em estufa. Este recipiente recebeu 1 L da solução de manipueira diluída a 50% acrescido de solução de Vishniac ( $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ). A capacidade máxima de adsorção do cianeto aos cubos de poliuretano, empregados como material suporte da pesquisa foi monitorado a partir da sua concentração inicial no meio durante um período de 90 minutos, sendo retiradas alíquotas de 10 em 10 min para análise no cromatógrafo.

### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste tópico serão detalhados os resultados com as respectivas discursões da caracterização da manipueira, teste de toxicidade, adaptação do micro-organismo a manipueira, bem como das operações em reatores em bateladas com biomassa fúngica dispersa e imobilizada, comparando-se os resultados obtidos com os de outros autores.

#### **5.1 Caracterização da manipueira**

Na caracterização da manipueira realizada 24 h após a prensagem (Tabela 6) foi encontrada elevada concentração de DQO ( $65000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e de açúcar redutor ( $15000 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Segundo Metcalf e Eddy (1991) apud Piveli (2006), um esgoto sanitário é considerado forte com DQO igual ou acima de  $400 \text{ mg.L}^{-1}$ , portanto, a manipueira do presente trabalho está bastante acima desse valor, 162,5 vezes maior. Segundo Sun *et al.* (2012), uma fecularia pode gerar de 20.000 a 60.000 litros de manipueira por tonelada de mandioca processada, sendo este o resíduo mais problemático pela elevada carga poluente.

A elevada concentração de DQO da manipueira deste trabalho pode ser comparada a de um esgoto industrial como, por exemplo, a de vinhaça, resíduo líquido oriundo da indústria sucroalcooleira que possui DQO de cerca  $55.000 \text{ mg.L}^{-1}$  (SOUZA *et. al*, 2016).

O hidrolisado amiláceo foi caracterizado em termos de açúcar redutor resultando em 105,4 g.L<sup>-1</sup>, o que evidencia positivamente a utilização da manipueira como fonte alternativa para o fornecimento de açúcares redutores no meio de cultivo de micro-organismos. É fundamental ressaltar que a composição da mandioca varia de um lugar para outro, e consequentemente, tal variação se estende também para seus resíduos (Tabela 6).

Tabela 6 - Caracterização da primeira manipueira extraída da mandioca fornecida pelo CETREX.

| UNIDADE            | VARIÁVEL       | CONCENTRAÇÃO |
|--------------------|----------------|--------------|
| % MS               | Sólidos Totais | 7            |
| mg.L <sup>-1</sup> | DQO            | 65000        |
|                    | Amônia         | 300          |
|                    | Nitrato        | 60           |
|                    | Nitrito        | 45           |
|                    | Açúcar Redutor | 105000       |
|                    | Cianeto        | 7,75         |
| -----              | pH             | 6            |

Fonte: Autor (2015).

Notou-se na Tabela 6 que ao comparar a caracterização da manipueira desta pesquisa com a de outros trabalhos (Cereda, 1994; Fernandes Junior, 1995; Barana, 1995; e Barana, 2000; percebeu-se que o valor obtido de DQO foi, aproximadamente, igual aos dos demais estudos (Tabela 7).

Quanto aos valores obtidos de frações nitrogenadas, bem como de sólidos totais, foram considerados superiores ao encontrado nos outros quatro estudos (Tabela 8). A presença de nitrogênio a torna atrativa para uso como meio de cultivo de fungos, como o *Aspergillus niger*, devido à importância desse elemento no metabolismo desses micro-organismos.

As concentrações dos constituintes da manipueira podem variar devido a fatores como a idade da planta, tempo após a colheita, tipo e ajuste de equipamentos industriais (CEREDA; MATTOS, 1996). Neves *et al.* (2014) observaram que em casos de mesma

variedade de mandioca, a composição da manipueira não pode ser considerada padrão, devendo ser determinada para cada local de cultivo e época do ano, o que evidencia que as relações edáficas e climáticas influenciam nas características da manipueira.

Tabela 7 - Composição média da manipueira extraída desta pesquisa comparada com a de outros autores.

|                    |                | FONTE           |                  |                               |                  |                  |
|--------------------|----------------|-----------------|------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
| VARIÁVEIS          |                | AUTOR<br>(2016) | CEREDA<br>(1994) | FERNANDES<br>JÚNIOR<br>(1995) | BARANA<br>(1995) | BARANA<br>(2000) |
| % MS               | Sólidos Totais | 7               | 6,28             | 6                             | 4,51             | 5,54             |
| mg.L <sup>-1</sup> | DQO            | 65000           | 63000            | 69300                         | 60000            | 62300            |
| mg.L <sup>-1</sup> | Nitrogênio     | 5000            | 4900             | 2000                          | 3000             | 1242             |

Fonte: Adaptado de Barana (2000).

O pH da manipueira foi determinado após 24 horas de prensagem da mandioca, período esse padronizado para as demais análises e seu valor médio foi de 6 (Tabela 6). Segundo Ribeiro *et al.* (2010), o pH inicial da manipueira, quando determinado no momento da prensagem, situa-se por volta de 6 e, momentos depois, percebe-se redução desses valores, por volta de 4, com posterior estabilização devido a atividade microbiana presente na manipueira. Neves *et al.* (2014) observaram que, após quatro horas da prensagem da mandioca, o valor médio de pH foi de 4,14, constataram ainda que a estabilidade do pH da manipueira ocorreu após 80 dias de armazenamento, sob condições naturais, e que, ainda segundo os autores, este é um parâmetro que varia em tempo curto, devido às interações químicas que ocorrem ao longo da decomposição da matéria orgânica e bem como da produção e consumo de ácidos orgânicos.

Os teores de cianeto encontrados neste manipueira foram de 7,75 mg.L<sup>-1</sup>, superiores ao que a Resolução 430/2011 do CONAMA (BRASIL, 2011) recomenda como padrão de lançamento que é de 1 mg.L<sup>-1</sup>, contudo, esse valor ainda é inferior ao encontrado por Neves (2014) que foi de 257,2 mg.L<sup>-1</sup>.

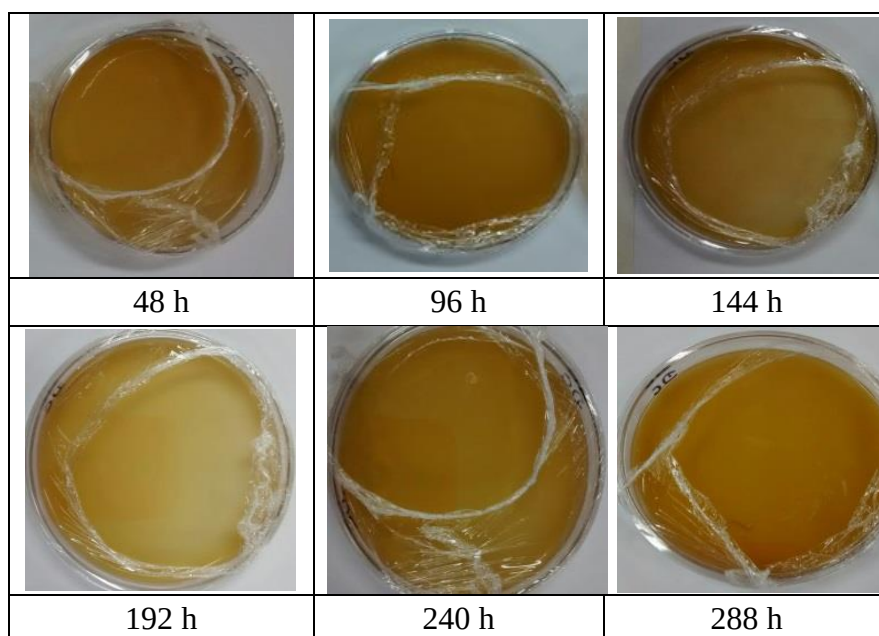
## 5.2 Teste de toxicidade

De acordo com os resultados obtidos do teste de toxicidade verificou-se que o fungo foi capaz de crescer em todas as concentrações de manipueira testadas, as quais variaram de 5% a 100%, conforme reportado (item 4.3), indicando que o mesmo tolerou a manipueira.

Nas placas contendo apenas meio de cultura PDA, sem manipueira e sem inoculação fúngica (Branco), não houve visualmente nenhum crescimento de fungos (Figura 13), como esperado.

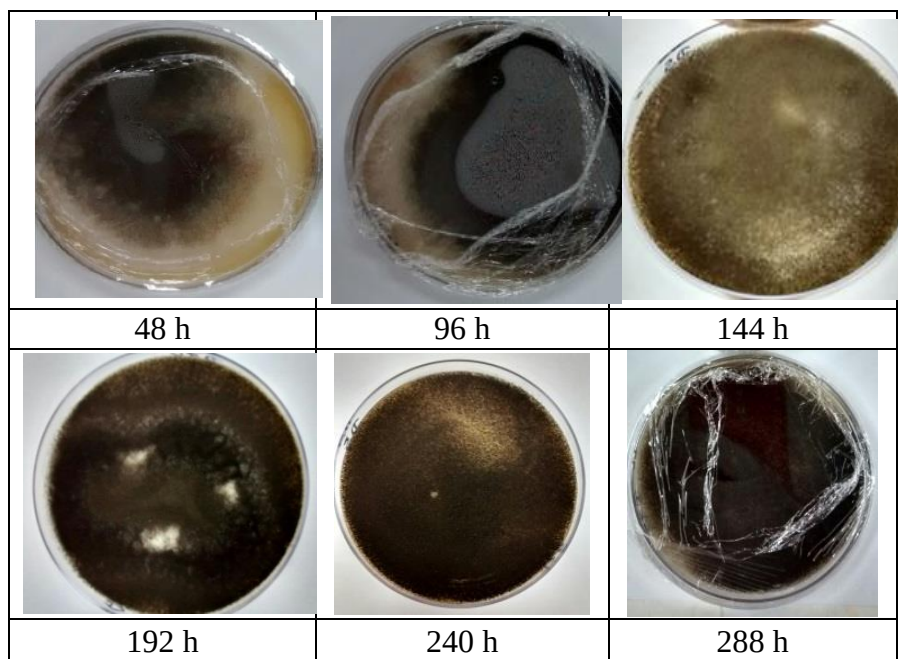
Na Figura 14 está apresentado o crescimento das colônias de *Aspergillus niger* AN 400 em placas de Petri contendo meio de cultura PDA ao longo de 288 h. Nas placas contendo ágar e manipueira, não foi possível visualizar crescimento fúngico nas primeiras 24 horas, sendo visualizado crescimento, apenas a partir das primeiras 48 horas, porém, sem que tenha ocorrido o preenchimento total e homogêneo das colônias por toda a superfície das placas.

Figura 13- Verificação das placas de Petri contendo meio de cultura PDA, sem manipueira e sem fungos (Branco), ao longo do teste de toxicidade.



Fonte: Autor (2015).

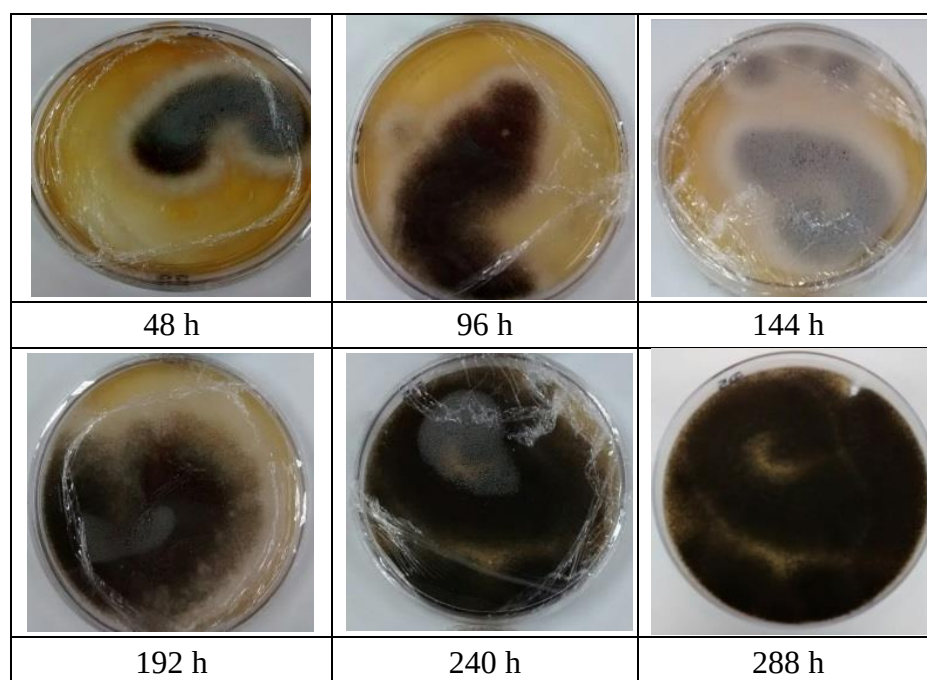
Figura 14- Crescimento de colônias de *Aspergillus niger* AN 400 em placas de Petri contendo meio PDA (Controle).



Fonte: Autor (2015).

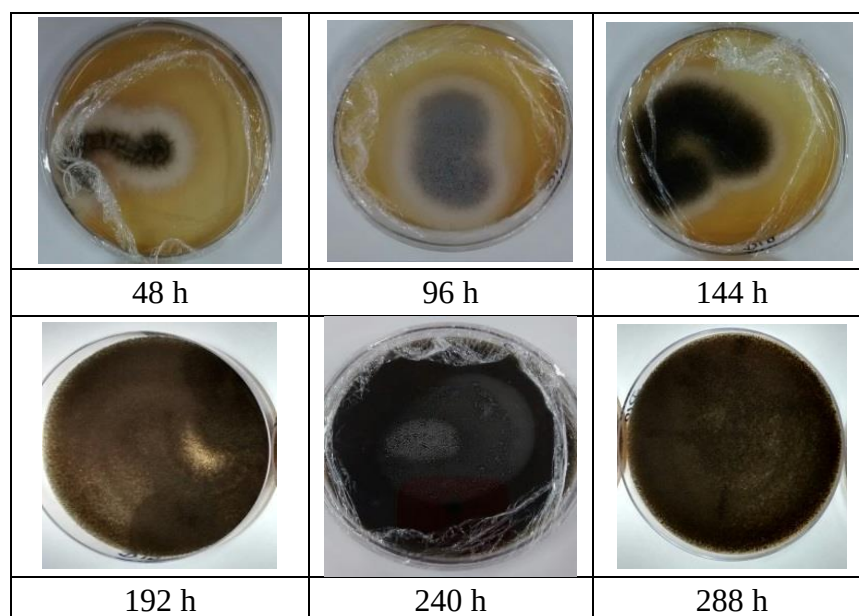
Nas placas que continham 5%, 10% e 25% (v/v) de concentração de manipueira, o crescimento dos fungos, evidenciado pela formação de esporos, ocorreu quase que completamente na superfície das placas com 192 h de inoculação, como provável reflexo da adaptação progressiva dos fungos aos compostos tóxicos presentes na manipueira (Figuras 15, 16 e 17), sendo que nas placas que continham meio PDA e fungos, a superfície apresentou cobertura da maior parte de sua área em 96 h, conforme apresentado na Figura 15.

Figura 15- Crescimento de colônias de *Aspergillus niger* AN 400 em placas de Petri contendo manipueria diluída em água a 5% (v/v).



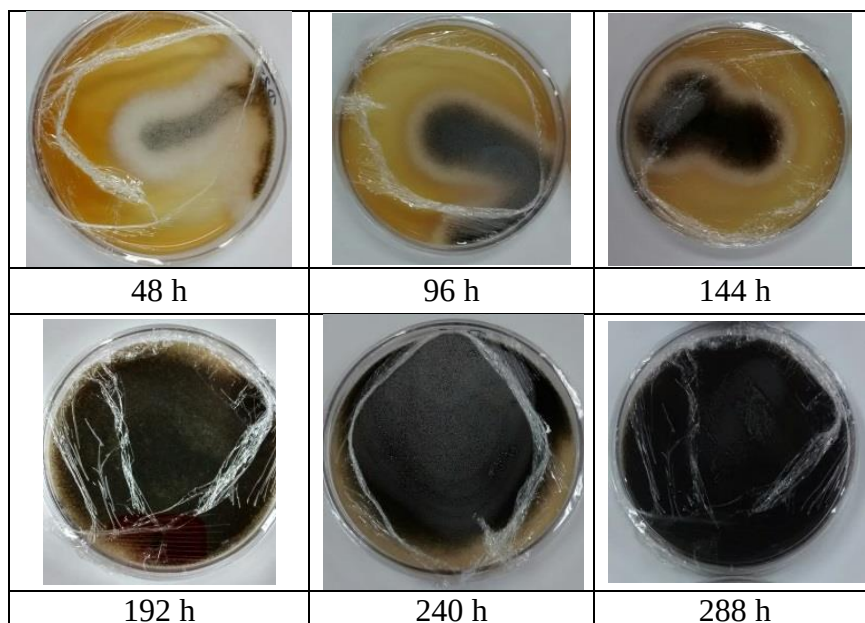
Fonte: Autor (2015).

Figura 16- Crescimento de colônias de *Aspergillus niger* AN 400 em placas de Petri contendo manipueria diluída em água a 10% (v/v).



Fonte: Autor (2015).

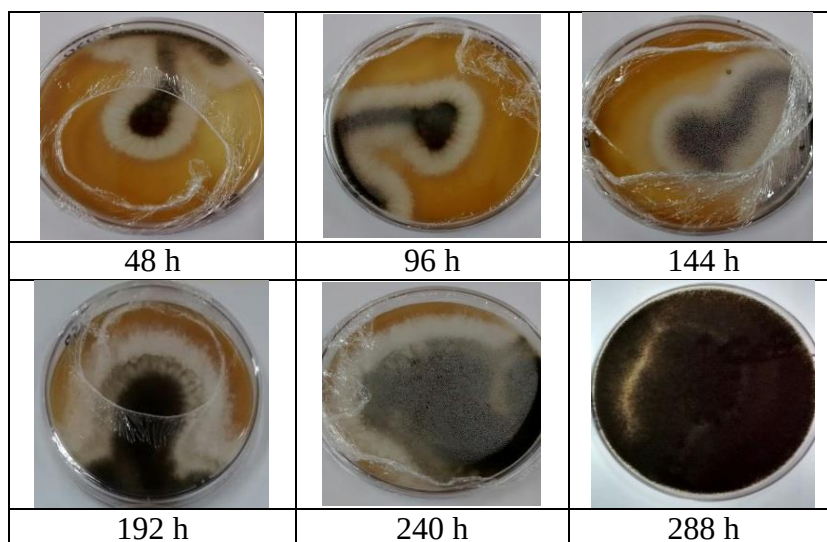
Figura 17- Crescimento de colônias de *Aspergillus niger* AN 400 em placas de Petri contendo manipueira diluída em água a 25% (v/v).



Fonte: Autor (2015).

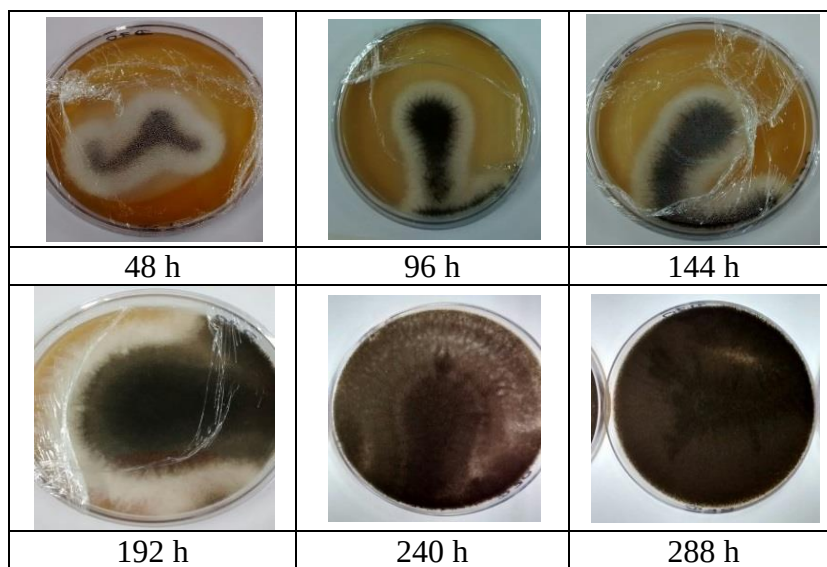
Com o aumento da concentração de manipueira, de 50% a 70% (v/v), a maior esporulação pôde ser visualizada apenas com 240 horas, conforme apresentado nas Figuras 18 e 19. O crescimento das colônias nas placas contendo 100% de manipueira necessitou de 288 horas da inoculação (Figura 20), indicando crescimento mais lento do fungo na presença da manipueira bruta.

Figura 18- Crescimento de colônias de *Aspergillus niger* AN 400 em placas de Petri contendo manipueira diluída em água a 50% (v/v).



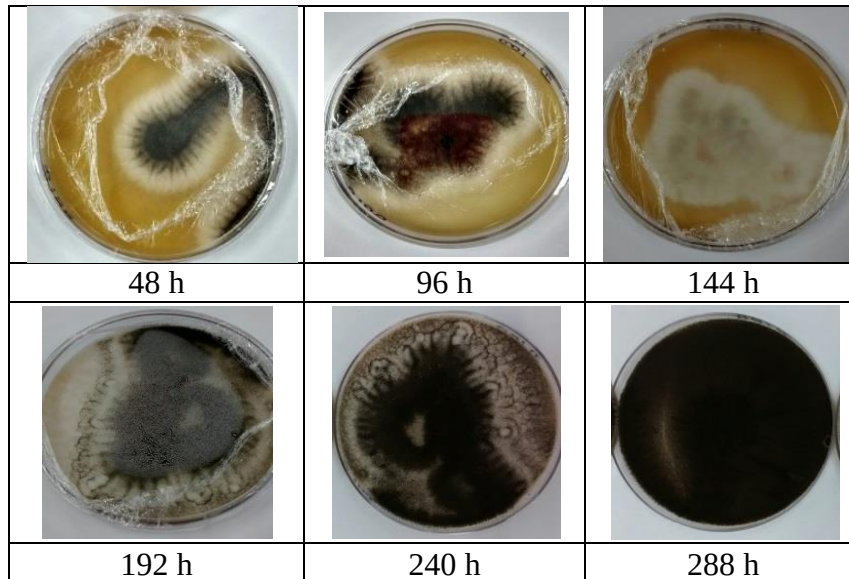
Fonte: Autor (2015).

Figura 19- Crescimento de colônias de *Aspergillus niger* AN 400 em placas de Petri contendo manipueria diluída em água a 70% (v/v).



Fonte: Autor (2015)

Figura 20- Crescimento de colônias de *Aspergillus niger* AN 400 em placas de Petri contendo manipueria a 100%.



Fonte: Autor (2015).

Nas placas de controle o crescimento em toda a placa ocorreu nas primeiras 48 horas de inoculação (Figura 20). Isto corroborou, que no caso das placas que continham agar e manipueira, o fungo estaria em processo adaptativo aos compostos presentes no referido substrato, dentre eles aos glicosídeos cianídricos, no decorrer do período de incubação. Certos micro-organismos possuem a capacidade de se reproduzirem em substratos contendo cianeto,

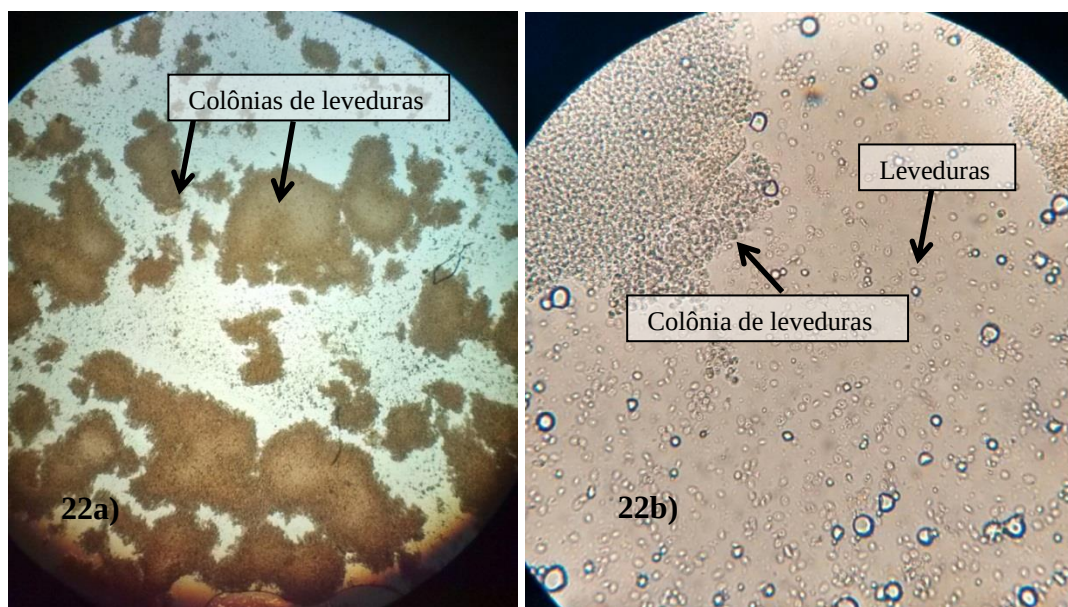
como foi relatado por Velmurungan *et al.* (2010) que isolaram e identificaram fungos retirados de uma amostra de solo contaminado por chumbo e cianeto e encontrou dentre eles, o fungo *Aspergillus niger*.

Pôde-se observar neste teste de toxicidade que o fungo *Aspergillus niger* AN 400 cresceu independentemente da porcentagem de diluição, havendo contudo, pequeno retardo de crescimento.

### 5.3 Adaptação do micro-organismo à manipueira

Após tempo de reação de 14 dias, nos reatores em que a manipueira não foi esterilizada (NE), não houve crescimento de biomassa filamentosa, porém observou-se a formação de pequenas esferas esbranquiçadas com características morfológicas aparentemente leveduras (Figura 21).

Figura 21- Imagens de leveduras presentes nos reatores não esterilizados (NE) após tempo reacional de 14 dias, fotografadas a partir de microscópio óptico com aumento de 100 X (a) e de 400 X (b).



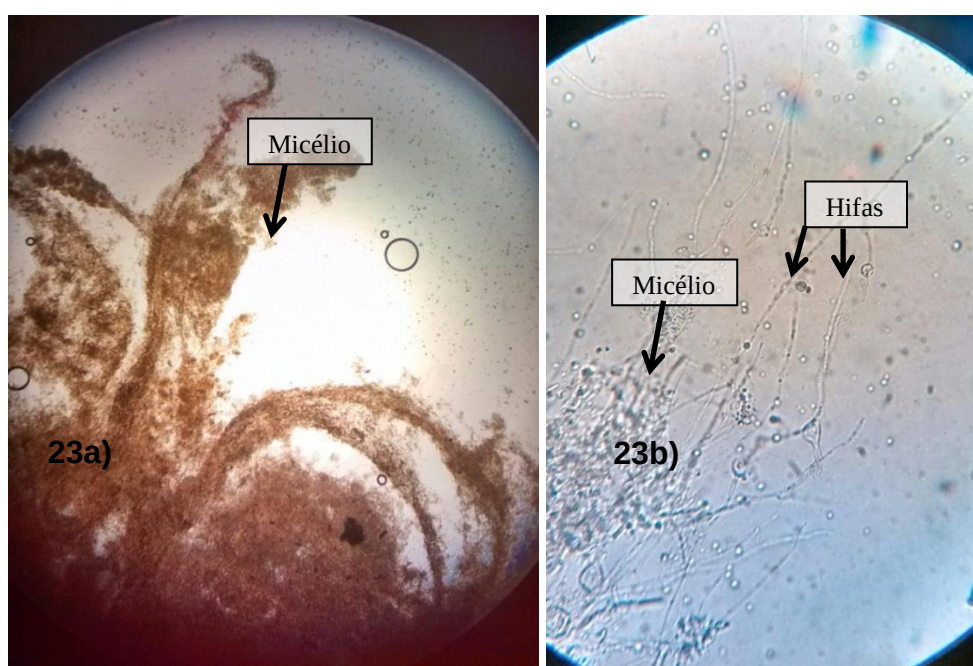
Fonte: Autor (2015).

Nos reatores que receberam a manipueira esterilizada (E), verificou-se o crescimento de biomassa filamentosa, sem o crescimento de leveduras, que com o processo de esterilização foram provavelmente eliminadas do meio. Segundo Grimm *et al.* (2005), os fungos filamentosos como *A. niger* apresentam morfologias de crescimento diferentes em

culturas submersas, variando de formas compactas (*pellets*) a formas filamentosas, que afetam fortemente o desempenho total das células.

O crescimento de biomassa filamentosa foi mais intenso, com maior esporulação, nos reatores contendo manipueira a 50% (v/v) (Figura 22). Os esporos presentes neste reator foram os selecionados para a produção de esporos.

Figura 22 - Imagens de biomassa filamentosa de *Aspergillus niger* AN 400 presentes nos reatores esterilizados a 100 % (v/v) fotografadas a partir de microscópio óptico com aumento de 100 X (Figura 23a) e de 400 X (Figura 23b).



Fonte: Autor (2015).

## 5.4 Operação em reatores em bateladas com biomassa fúngica dispersa

### 5.4.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

Nos reatores controle (RC50) houve pequena oscilação do pH (4,59 a 5,48), sendo que na maior parte do tempo permaneceu entre 5 e 6 (Figura 23). Segundo Ribeiro *et al.*, (2010), o pH inicial da manipueira quando determinado no momento da prensagem situa-se por volta de 6 e momentos depois ocorre uma redução desse valor, provavelmente, devido a produção de ácidos orgânicos pela atividade microbiana. Contudo, Leonel e Cereda (1995) analisaram o pH da manipueira nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas e perceberam que o pH inicial

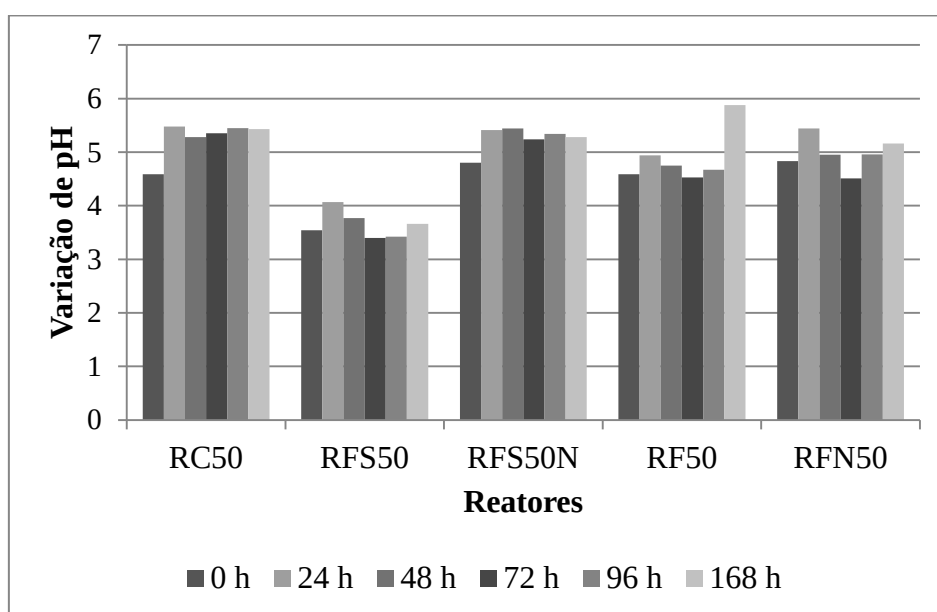
foi de 6,2 e decaiu para 4,0 com 24 h de repouso e se estabilizou em 3,6 com 48 e 72 h. Os resultados obtidos com os reatores controle portanto foram próximos do encontrados na literatura.

Em relação aos reatores RFS50N, RF50 e RFN50, o pH ficou ligeiramente inferior aos valores encontrados nos reatores RC50. Contudo, os reatores RFS50 apresentaram os menores valores de pH dentre todos ((Figura 23).

Todos os reatores apresentaram faixa de pH entre 3 e 6, que é considerada uma faixa boa para crescimento fúngico. Segundo Griffin (1994), o pH ótimo para o desenvolvimento de vários fungos encontra-se na faixa entre 4,0 e 6,0, porém, a maioria dos fungos filamentosos tolera variações de pH entre 2,0 e 9,0. Os valores de pH mais adequados para a atividade de *Aspergillus niger* são aqueles próximos de 4,0 (DACERA; BABEL, 2008; KYRIACOU *et al*, 2005; MISHRA; LATA, 2004).

Um fator que pode reduzir o pH é a presença de fontes de carbono e nitrogênio, Lehninger *et al.* (2014) afirmaram que o *Aspergillus niger* quando cultivado na presença de meios contendo fontes de nitrogênio e carbono pode produzir moléculas ácidas, dependendo do metabolismo predominante. O sulfato de amônio, por exemplo, utilizado em alguns reatores como uma das fontes de nitrogênio, pode provocar redução do pH (SCHMIDEL, 2001).

Figura 23- Variação do pH nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 durante 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

### 5.4.2 DQO

A cinética de decaimento de DQO nas bateladas com biomassa dispersa é apresentada nas Figuras 24 e 25. Na Tabela 8 estão apresentadas as constantes cinéticas de decaimento, bem como os percentuais de remoção.

Reatores que continham sacarose (RFS50), reatores adicionados com fontes de nitrogênio (RFN50) e reatores com sacarose suplementados com nitrogênio (RFS50N) apresentaram no TR de zero hora aumento na concentração de DQO em relação aos seus controles (RC50) (Figura 24).

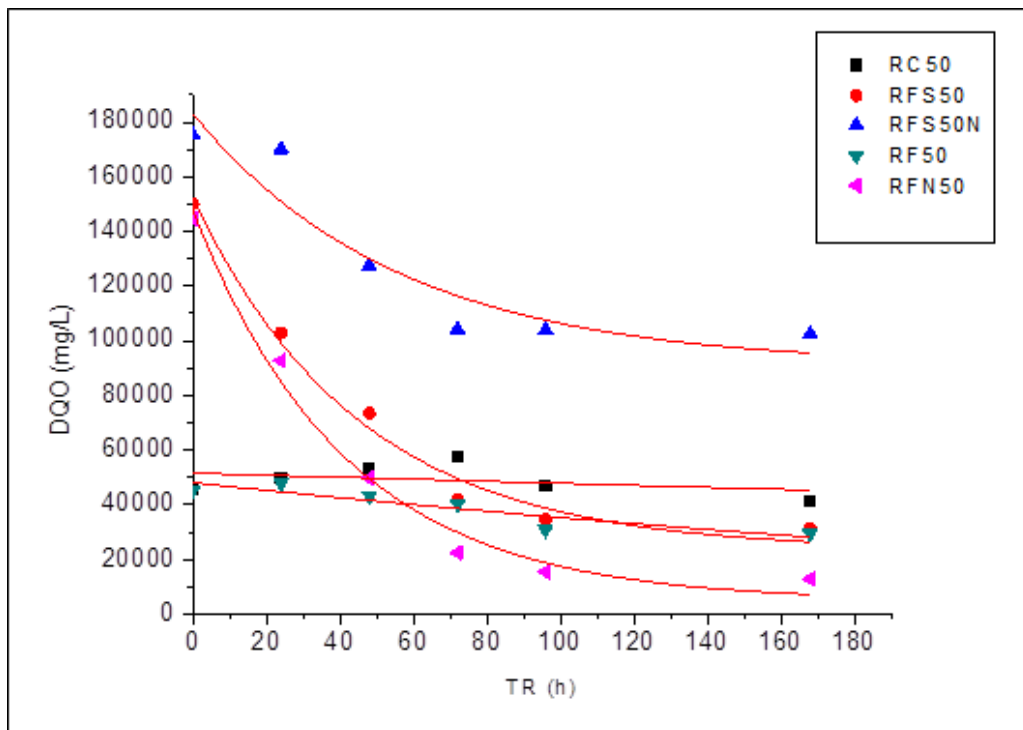
A adição de sacarose e nitrogênio aumentou a concentração de matéria orgânica nos reatores, o que refletiu no aumento dos dados de DQO no TR de zero hora. Os reatores controles (RC50) não tiveram muita variação em relação à DQO, o que indicou que não houve atividade microbiana nesses reatores.

Dentre os reatores experimentais que continham manipueira, o que teve a melhor remoção foi o reator RFN50, com remoção de 91%. Resultado próximo ao encontrado por Xu *et al.* 2015 que em estudo utilizando mandioca como substrato para produção de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* observaram remoção de matéria orgânica acima de 90%.

No reator que continha a mesma concentração de manipueira e adição de sacarose a 10% (RFS50) a remoção diminuiu para 79%, enquanto que no reator que continha tanto nitrogênio como sacarose, a remoção foi ainda menor, 42%. Contudo, quando considerado apenas a suplementação de nitrogênio, a remoção foi mais eficiente (91%), indicando que este seja essencial para o crescimento fúngico. Sabe-se que o fungo precisa de nitrogênio para o seu crescimento, portanto uma melhor suplementação desse nutriente pode garantir um maior crescimento da biomassa fúngica (ESPOSITO; AZEVEDO 2004; TRABULSI, 2005).

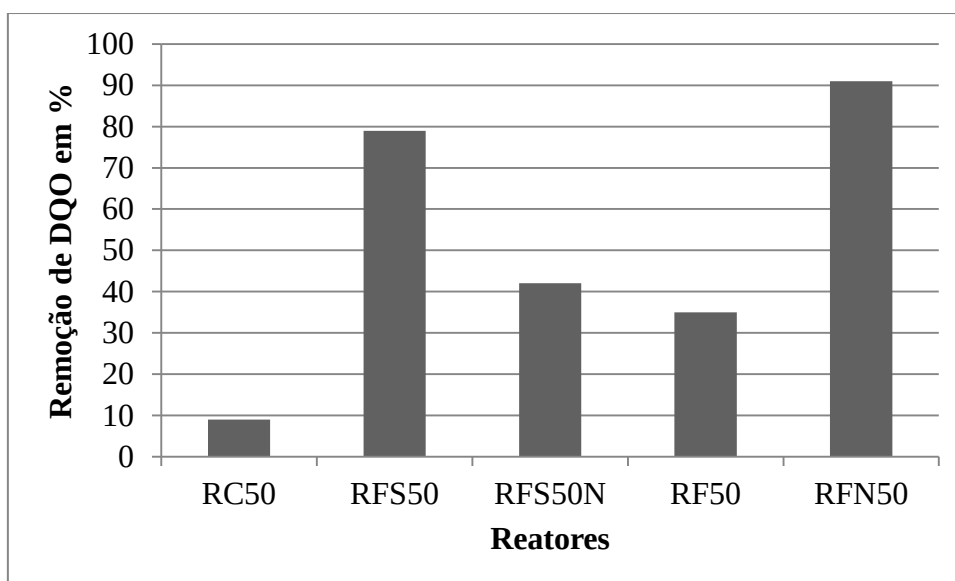
Bueno (2009) utilizou esterco de porco adaptado como inóculo para o tratamento de manipueira sob aeração contínua, e obteve em um TR de 24 horas, uma redução máxima da DQO do efluente de 99,8%, com redução média de 98,4 %. Ainda, em trabalho realizado por Almeida (2005), utilizando reator aeróbio com aeração contínua no tratamento da manipueira, obteve-se redução de concentração de DQO de 93%. Resultados superiores aos encontrados no presente trabalho no reator RFS50, de 91 %.

Figura 24- Cinética de decaimento de DQO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 durante 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

Figura 25 – Eficiência de remoção de matéria orgânica (%) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 durante 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

A partir da Tabela 8 é possível observar que os reatores RFN50 e RFS50 possuem os maiores valores de  $R^2$ , de 0,97979 e 0,97779 respectivamente, superiores aos encontrados nos reatores RFS50N e RF50 (0,81213 e 0,72968). Excetuando-se o reator controle (RC50), os valores da constante de velocidade  $k$  aumentaram na ordem: RFN50 > RF50 > RFS50 > RFS50N. Verifica-se, portanto, que os reatores que continham nitrogênio e sacarose isoladamente são mais eficientes quando comparados ao que continha os dois juntos.

As velocidades dos reatores RFN50 e RFS50 são respectivamente, 1,35 e 1,23 vezes maior do que a do reator RFS50N, o que indica que isoladamente a adição de nitrogênio e de sacarose formaram boas condições para a remoção de matéria orgânica pelo fungo *Aspergillus niger*, ao passo que quando colocadas conjuntamente, essa remoção fica prejudicada.

Contudo, quando na ausência dessas variáveis, isoladas ou conjuntas, a eficiência de remoção de DQO fica mais comprometida, visto que no reator que continha apenas manipueira e o fungo (RF50), a remoção cai para apenas 35%.

Tabela 8 - Cinética de decaimento e eficiência de remoção de DQO ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 durante 168 h de experimento.

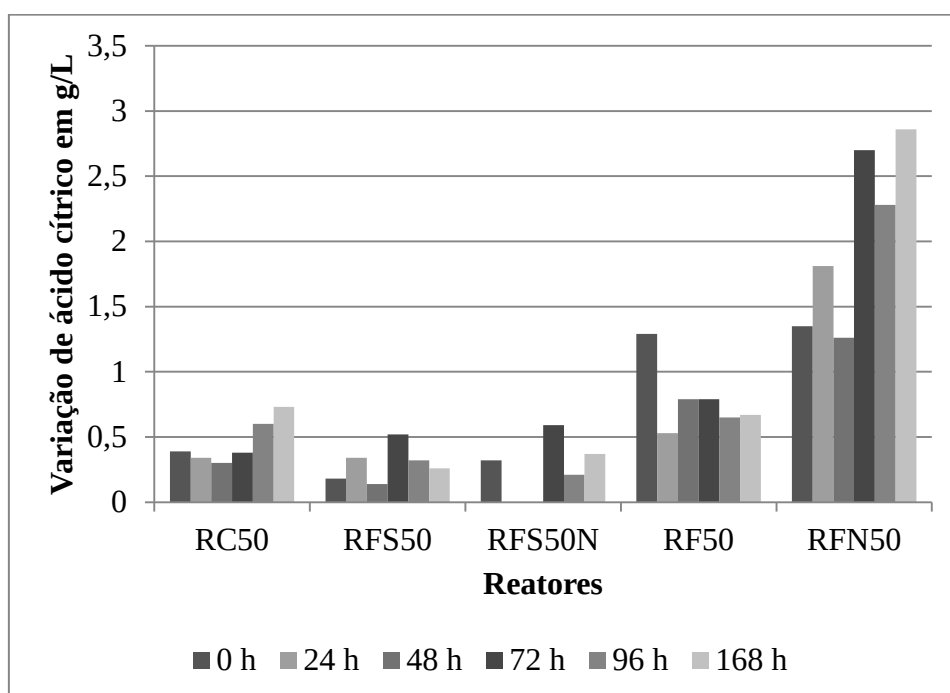
| REATOR | $k \text{ (h}^{-1}\text{)}$ | $R^2$    | REMOÇÃO % |
|--------|-----------------------------|----------|-----------|
| RC50   | 3,201742E-08                | -0,42485 | 9         |
| RFS50  | 2,204397E-02                | 0,97779  | 79        |
| RFS50N | 1,782492E-02                | 0,81213  | 42        |
| RF50   | 2,245193E-03                | 0,72968  | 35        |
| RFN50  | 2,413542E-02                | 0,97979  | 91        |

Fonte: Autor (2015).

### 5.4.3 Ácido Cítrico

Nas Figuras 26 estão apresentados os resultados obtidos para a produção de ácido cítrico nos reatores com biomassa dispersa.

Figura 26- Variação de ácido cítrico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 no TR de 168 h.



Fonte: Autor (2015).

Na caracterização, foi observado que já havia produção de ácido cítrico, que se deve ao fato da existência de micro-organismo presentes na manipueira, como as leveduras encontradas na etapa de adaptação do micro-organismo à manipueira (item 5.3), que podem ter produzido essa quantidade de ácido orgânico.

A maior produção de ácido cítrico, contudo, foi observada no reator RFN50 que teve uma produção de  $0,79 \text{ g.L}^{-1}$  com TR de 72 h, e de  $2,86 \text{ g.L}^{-1}$  com 168 h de experimento. O que comprova mais uma vez que a suplementação de nitrogênio foi essencial para o crescimento da biomassa fúngica e também para a produção do ácido cítrico. Qualquer aumento ou diminuição na concentração de nitrogênio no meio de fermentação faz com que ocorram oscilações na produção de ácido cítrico, pois interferem diretamente no metabolismo dos ácidos orgânicos (SIKANDER *et al.*, 2004).

Um exemplo de que a suplementação de nitrogênio é importante para a produção de ácido cítrico é encontrada por Pastore, Hasan e Zempulski (2011) que ao investigar a produção de ácido cítrico por fermentação submersa utilizando meio sintético enriquecido com sacarose pelo fungo *Aspergillus niger*, além de diferentes fontes de nitrogênio como o sulfato de amônio, a uréia e a peptona, observaram que a associação de uma ou mais fontes de nitrogênio ao meio de cultivo proporciona maiores rendimentos, sendo que a adição de peptona associada ao sulfato de amônio resultou, no tempo de fermentação de 24 h, numa maior produtividade de ácido cítrico ( $62,9 \text{ g.L}^{-1} \text{ dia}$ ), porém, esse valor foi bem superior ao encontrado nesta pesquisa.

Às vezes a fonte de nitrogênio escolhida na suplementação pode prejudicar o processo fermentativo da produção de ácido cítrico. Como por exemplo Xu *et al.* (2015), que em estudo utilizando mandioca como substrato para produção de ácido cítrico observaram que a matéria-prima utilizada, já era rica em nitrogênio e que amônia adicional poderia inibir a produção de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger*. Isto pode explicar a baixa produção de ácido cítrico neste trabalho, pois o sulfato de amônia foi uma das fontes de nitrogênio utilizada nos reatores RFS50 e RFN50, esses reatores receberam também peptona como fonte de nitrogênio, e a assimilação desta é lenta devido a necessidade da decomposição da mesma para a liberação do nitrogênio, conseqüentemente durante o processo de decomposição também pode ocorrer uma degradação do ácido cítrico já produzido (PASTORE; HASAN; ZEMPULSKI, 2011).

A produção de ácido cítrico foi acompanhada pela maior remoção de matéria orgânica, sugerindo que o fungo utilizou os compostos presentes na manipueira para produzir ácido cítrico. A literatura revela que, embora haja variação em relação ao organismo e às condições de cultivo, a produção do ácido cítrico inicia-se entre 80 e 120 horas de cultivo (idiofase) (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). Sendo que no presente trabalho, a maior produção de ácido cítrico ocorreu no período entre 72 h e 168 h.

A concentração de ácido cítrico produzido pelo *A. niger* pode variar de acordo com as características dos compostos presentes no substrato. No trabalho de Santos (2005), por exemplo, a produção de ácido cítrico por fermentação submersa de hidrolisado hemicelulósico utilizando cepas de *Aspergillus niger* e controle de concentração de açúcares, metais e oxigênio obteve concentrações de, aproximadamente,  $14,98 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido cítrico, sendo maior do que no presente trabalho.

Neste trabalho, nos reatores com sacarose na concentração de  $100 \text{ g.L}^{-1}$ , houve pouca produção de ácido cítrico  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  no TR de 72 h no reator RFS50, resultado inferior

ao alcançado por Pastore, Hasan e Zempulski (2011) que com concentrações de  $50 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose no meio de fermentação (composição original do meio sintético de Prescott e Dunn) obtiveram valores de acúmulo de ácido cítrico expressivos ( $62,9 \text{ g.L}^{-1} \text{ dia}$ ) no pH 5,3 sem que se houvesse utilizado qualquer tipo de correção no meio de fermentação. Neste trabalho o pH ficou em torno de 5 no reator de melhor eficiência de produção do ácido (RFN50).

#### 5.4.4 Cianeto

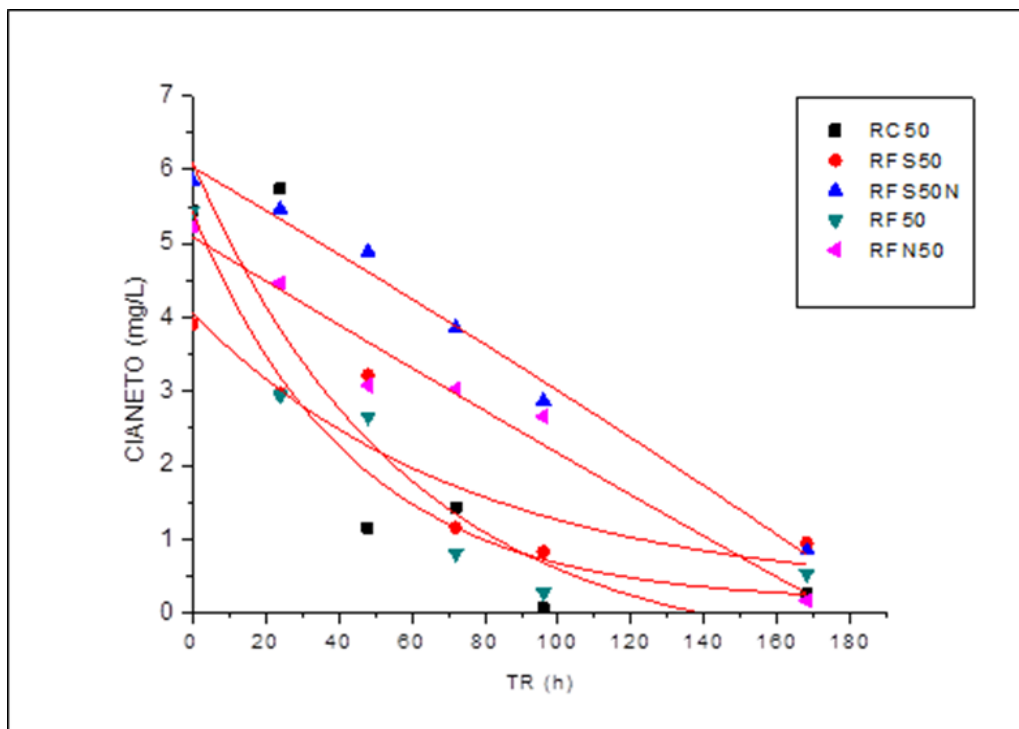
Nas Figuras 27 e 28 é apresentada a cinética de decaimento, e na Tabela 9 a eficiência de remoção de cianeto, bem como as constantes de velocidade no período de 168 h de reação em batelada com biomassa dispersa.

Em todos os reatores que continham manipueira e fungos foi possível observar remoção de cianeto, contudo, essa maior remoção ocorreu no reator RFN50 com 97% de remoção, sendo que, nesta condição de adição de nitrogênio pode-se observar que os fungos preferiram as condições presentes neste reator, além de ter sido também onde foi encontrada tanto a maior remoção de DQO como a maior produção de ácido cítrico.

Contudo, a remoção no controle RC50 foi de 95%, o que pode ter ocorrido devido à própria volatilização dos ácidos cianídricos, visto que a redução dos mesmos ocorre naturalmente com o tempo de armazenamento em repouso. Neves *et al.* (2014) observaram que os teores médios de cianeto livre na manipueira detectados no dia da coleta (tempo 0), foram elevados, entretanto, aos 20 dias de armazenamento os teores já haviam reduzido cerca de seis vezes, passando de  $129,00$  para  $20,66 \text{ mg L}^{-1}$  e aos 40 dias esse valor atingiu apenas  $7,13 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo que aos 60 dias não mais foram detectados teores de cianeto na manipueira.

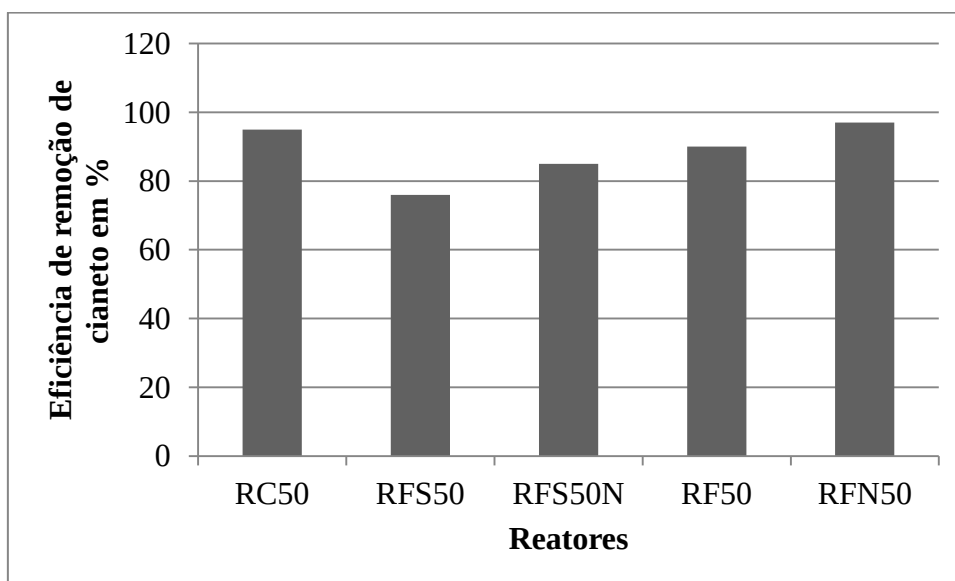
Parece que a agitação do reator aumentou a volatilização do cianeto. Ismail *et al.* (2009), por exemplo, aplicou duas faixas de concentração inicial de cianeto: (1) uma escala baixa com concentração inicial de  $\text{CN}^-$  entre 10 e 50 mg/L e (2) uma escala alta com concentração inicial de  $\text{CN}^-$  entre 200 e 500 mg/L. Observou-se que 30 minutos de agitação foram suficientes para atingir um nível admissível de baixa concentração de cianeto para a faixa de baixa concentração inicial, enquanto são necessários 120 minutos de agitação para atingir o nível admissível de baixa concentração de cianeto para as soluções pertencentes à faixa de alta concentração inicial.

Figura 27- Cinética de decaimento de cianeto ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 durante 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

Figura 28- Eficiência de remoção de cianeto em % nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 durante 168 h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

A partir da Tabela 9 é possível observar que os reatores RFSN50, RFN50 e RF50 possuem os maiores valores de  $R^2$ , de 0,98105, 0,94182 e 0,91139 respectivamente, superiores aos encontrados nos reatores RFSN (0,71103) e RC50 (0,69188). Excetuando-se o reator controle (RC50), os valores da constante de velocidade  $k$  aumentaram na ordem: RF50 > RC50 > RFS50 > RFN50 > RFS50N.

A maior velocidade do reator RF50 indica que nas horas iniciais houve uma rápida remoção do cianeto, contudo essa remoção ao final do TR de 168 horas foi de 90%, menor do que aquela encontrada no reator suplementado com nitrogênio (RFN50) de 97%, que obteve uma baixa constante de velocidade  $k$ , contudo, não se pode afirmar que o fungo efetivamente removeu o cianeto, visto que no controle também houve redução desses valores.

A alta velocidade do reator RC50 indica que pode ter ocorrido uma volatilização dos ácidos cianídricos pela simples aeração do reator, como já citado anteriormente, chegando a este reator ser o de segunda melhor remoção, ficando atrás apenas do reator RFN50.

Tabela 9 - Cinética de decaimento e eficiência de remoção de cianeto ( $\text{g.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada (RC50, RFS50, RFS50N, RF50 e RFN50) com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 durante 168 h de experimento.

| REATOR | $k$ ( $\text{h}^{-1}$ ) | $R^2$   | REMOÇÃO (%) |
|--------|-------------------------|---------|-------------|
| RC50   | 0,0171                  | 0,69188 | 95          |
| RFS50  | 0,0133                  | 0,71103 | 76          |
| RFS50N | 0,0000                  | 0,98105 | 85          |
| RF50   | 0,0229                  | 0,91139 | 90          |
| RFN50  | 0,0006                  | 0,94182 | 97          |

Fonte: Autor (2015).

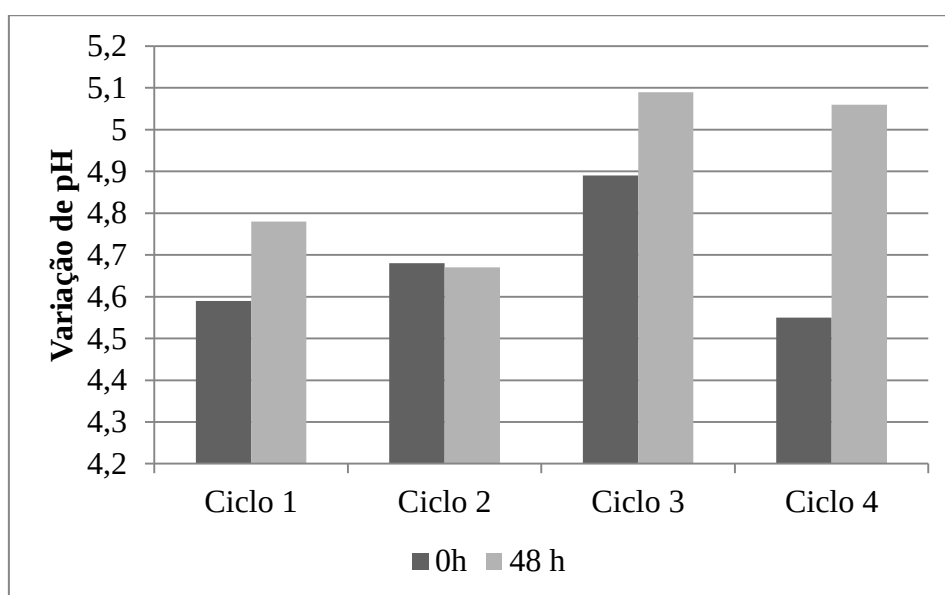
## 5.5 Operação em Reatores em Bateladas com biomassa fúngica imobilizada

### 5.5.1 pH

Conforme exposto na Figura 29, houve pouca variação de pH durante as 48 h reacionais nos dois primeiros ciclos, nos demais permaneceu ácido, em torno de 5, pH este considerado adequado para operação em processos aeróbios (SANT'ANNA JÚNIOR, 2010). Leonel e Cereda (1995) analisaram o pH da manipueira nos tempos 0, 24, 48 e 72 h e perceberam que o pH inicial que foi de 6,2, diminuiu para 4,0 com 24 h de repouso e se estabilizou em 3,6 com 48 e 72 h. Leonel *et al.* (1991) relataram que nas primeiras horas de armazenamento da manipueira há uma elevação dos teores de cianeto livre e total, o que pode justificar o abaixamento momentâneo do pH.

Nos ciclos 3 e 4 houve aumento do pH no tempo de reação de 48 h, sendo esse aumento maior no quarto ciclo. Analisando as Figuras 30 e 35, percebeu-se que a medida que o teor de cianeto diminuiu, o pH aumentou. Esse comportamento, foi também observado por Neves *et al.* (2014), contudo, as análises realizadas por esses autores eram realizadas a cada 20 dias em um intervalo bem maior do que o proposto no presente trabalho.

Figura 29- Variação de pH nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

### 5.5.2 DQO

A cinética de decaimento e a eficiência de remoção de DQO nas bateladas com biomassa imobilizada são apresentadas nas Figuras 30 e 31 e na Tabela 10.

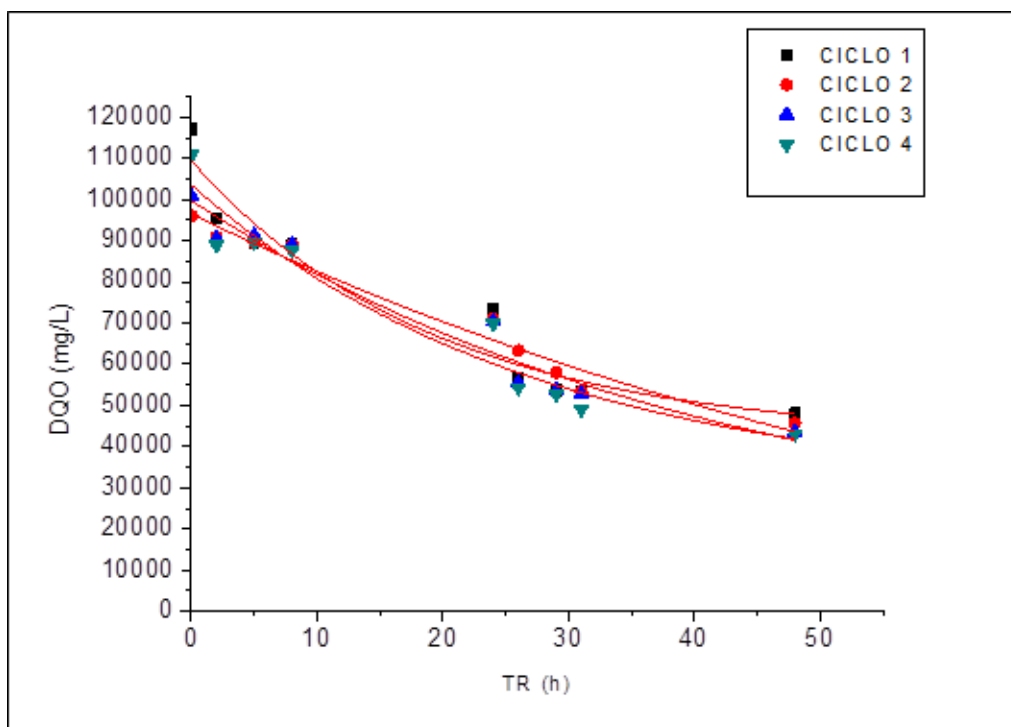
A remoção de DQO variou de 52% a 60% nos ciclos, resultado inferior aos encontrados nos reatores com biomassa dispersa nas mesmas condições, que foi de 91%. Provavelmente, o menor tempo de reação tenha influenciado para esta diminuição.

Contudo, Bueno (2009) utilizando esterco de porco adaptado como inóculo para o tratamento de manipueira sob aeração contínua, obteve em um TR de 24 horas, uma redução máxima da DQO do efluente de 99,8%, com redução média de 98,4 %. Ainda, em trabalho realizado por Almeida (2005), utilizando reator aeróbio com aeração contínua no tratamento da manipueira, obteve-se redução de concentração de DQO de 93%. Resultados superiores aos encontrados no presente trabalho. Porém, esses trabalhos não utilizaram uma cepa específica de fungo no tratamento do efluente, mas sim micro-organismos já presentes na manipueira, que agiram de forma consorciada, o que pode ter favorecido na eficiência dos reatores.

Novaes (2011), testou a capacidade em degradar matéria orgânica e elevar o pH do meio em três diferentes ambientes: aerado (AE), não aerado (NAE) e não aerado restrito (NAER), em concentrações de DQO baixa ( $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), média ( $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) e alta  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , com e sem meio suporte. A cultura mista de fungos mostrou habilidade em biodegradar manipueira com um pH inicial de 4,5 e DQO de  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , elevando o pH para valores acima de 8,5, em 27 d, com 13% de DQO remanescente, em ambas condições, aerada e não aerada. A condição NAER não foi adequada para o tratamento de efluentes, pois levou 75 dias para remover 85% da matéria orgânica presente no meio. Os resultados indicaram que a concentração inicial de compostos de nitrogênio no meio tem papel importante no tamponamento do sistema. A espuma de poliuretano usada como meio suporte, não foi eficiente, tendo em vista que não ocorreu aderência expressiva de biomassa fúngica no mesmo (NOVAES, 2011).

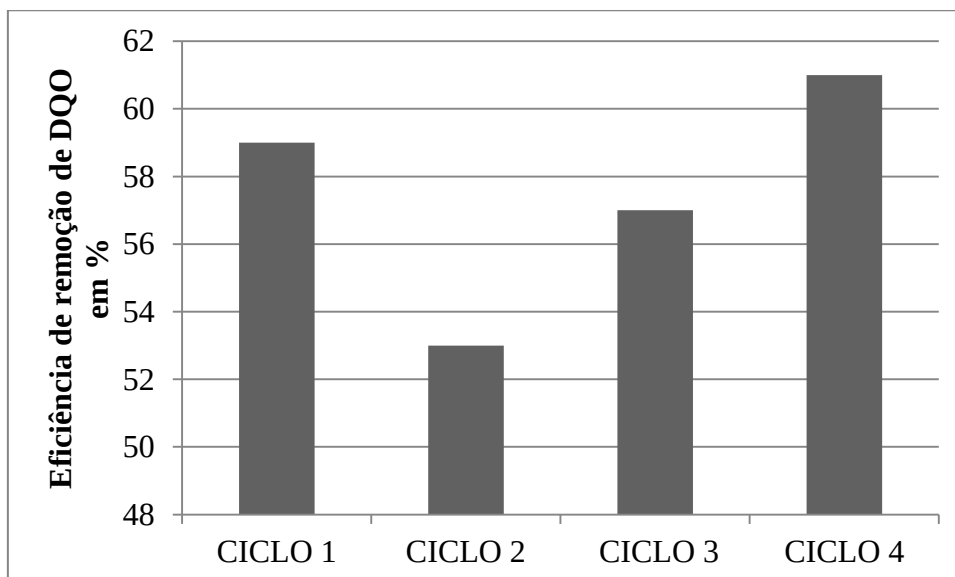
Outros autores, entretanto, estudando o *A. niger* com biomassa imobilizada na remoção de poluentes observaram que o fungo quando no meio suporte possui maior capacidade de remoção de matéria orgânica quando comparado com a biomassa dispersa. Marinho *et al.* 2012, por exemplo, relataram estudos com melhoria na eficiência de degradação de compostos recalcitrantes e/ou xenobióticos por *Aspergillus niger* AN 400 em biomassa imobilizada, diferentemente do acontecido nesta pesquisa.

Figura 30- Cinética de decaimento de DQO ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

Figura 31- Eficiência de remoção de DQO (%) nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

A remoção de DQO foi maior no quarto ciclo, onde se pode verificar a remoção de 61%, provavelmente, devido a uma maior aclimação do fungo. À medida que a população microbiana aumenta, desde que haja condições propícias para esse crescimento, menor será a disponibilidade de alimento e consequentemente, de matéria orgânica (KYRIACOU *et al.*, 2005).

A partir da Tabela 10 é possível observar que os quatro ciclos possuem valores muito próximos de  $R^2$ , variando de 0,9104 a 0,9573.

Os valores das constantes de velocidade  $k$  aumentaram na ordem: ciclo 1 > ciclo 4 > ciclo 3 > ciclo 2. A velocidade do ciclo 1 é 4 vezes maior do que a do ciclo 2. O fungo, portanto, respondeu rápido à remoção de DQO nas primeiras horas, contudo, no segundo ciclo houve um queda nessa remoção, havendo uma recuperação nos ciclos 3 e 4. Nas primeiras horas, o fungo, por estar bem crescido e aderido ao meio suporte obteve uma rápida resposta ao meio que estava sendo colocado, contudo, o cianeto pode ter feitos com que nas horas subsequentes o fungo fosse prejudicado, recuperando-se nos ciclos 3 e 4.

O que leva a conclusão de que um maior número de ciclos, além dos 4 estudados, pudesse ocasionar em uma melhor taxa de remoção de DQO, visto que a partir do ciclo 2 ao ciclo 4, houve uma ascendente aumento no percentual de remoção, de 53%, 57% e 61%. Assim como das constantes de velocidade  $k$ , que foram de 0,013, 0,023 e 0,036.

Tabela 10 - Cinética de decaimento e eficiência de remoção de DQO nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 durante quatro ciclos de 48 h de experimento.

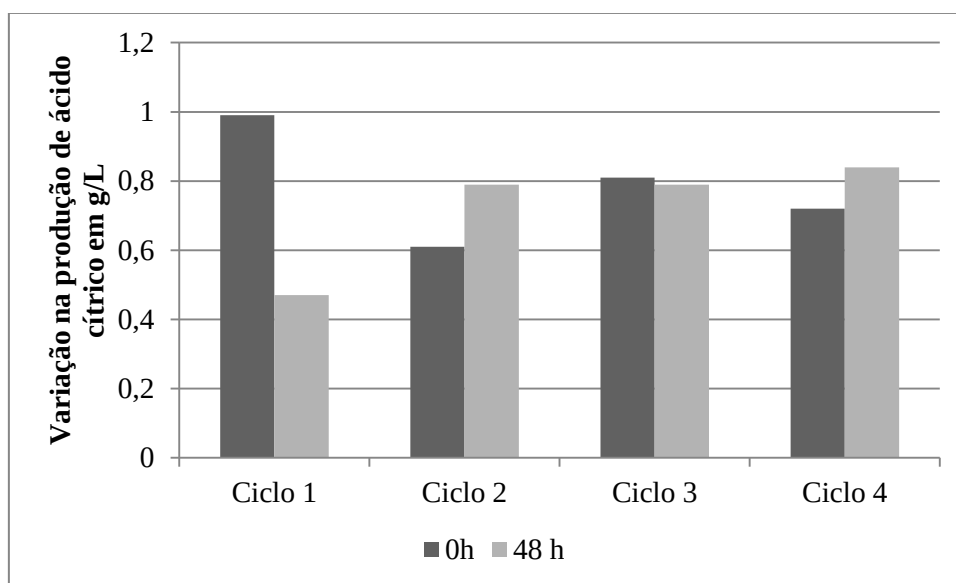
|         | $k \text{ (h}^{-1}\text{)}$ | $R^2$  | REMOÇÃO (%) |
|---------|-----------------------------|--------|-------------|
| CICLO 1 | 0,052                       | 0,9104 | 59          |
| CICLO 2 | 0,013                       | 0,9573 | 53          |
| CICLO 3 | 0,023                       | 0,9435 | 57          |
| CICLO 4 | 0,036                       | 0,9139 | 61          |

Fonte: Autor (2015).

### 5.5.3 Ácido Cítrico

Em relação à produção de ácido cítrico, foi possível observar na Figura 32 que houve produção apenas no ciclo 4 de  $0,84 \text{ g.L}^{-1}$ , contudo, foram valores bem menores do que aqueles encontrados por Leonel e Cereda (1995), que em sua pesquisa de biossíntese de ácido cítrico em resíduo líquido de manipueira utilizando apenas uma cepa de *Aspergillus niger* atingiu  $2,56 \text{ g.L}^{-1}$  de ácido cítrico em meio sintético e  $2,86 \text{ g.L}^{-1}$  em resíduo de manipueira, enquanto que Prado *et al.* (2005), com a fermentação no estado sólido do bagaço de mandioca, utilizando, também, *Aspergillus niger*, conseguiu um acúmulo de ácido cítrico correspondente a 26,9 g por 100 g de bagaço. Provavelmente, a diluição da manipueira tenha influenciado nos menores resultados encontrados, nesta pesquisa.

Figura 32- Variação de ácido cítrico ( $\text{g.L}^{-1}$ ) obtidos nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 com TR de 48 h..



Fonte: Autor (2015).

Os resultados apresentados evidenciaram que a imobilização da biomassa não foi satisfatória para a produção de ácido cítrico. Pode ter ocorrido que nesse TR de 48 horas, o fungo deva ter consumido o que estava sendo produzido de ácido cítrico. Foi observado diminuição da produção de ácido cítrico nos ciclos 1, 2 e 3, o que pode indicar consumo do mesmo. Outra hipótese é que o tempo de reação de 48 h não tenha sido satisfatório para a produção do ácido cítrico, visto que tanto na literatura, como na fase II deste trabalho, a produção de ácido cítrico inicia-se entre 80 e 120 horas de cultivo (ANGUMEENAL;

VENKAPPAYYA, 2013). Betiku e Adesina (2013) em estudo da otimização da produção de ácido cítrico a partir do meio de amido hidrolisado de batata doce utilizando *A. niger* observaram o efeito de cinco variáveis independentes na produção do ácido, dentre elas o pH e o tempo de reação, e observaram que a melhor produção ( $83 \text{ g.L}^{-1}$ ) ocorreu após 8 dias e pH 6.

A estimativa de produção de ácido cítrico descrita na literatura é bem variável, mas essas diferenças são em virtudes dos processos utilizados, substratos ou até mesmo a cepa utilizada. Um exemplo disso foi encontrado por Adeoye, Lateef e Gueguim-Kana (2015), que ao utilizarem uma cepa mutante de *Aspergillus niger* para produção de ácido cítrico tendo como substrato casca de mandioca observaram que a cepa mutante produziu 4,87 vezes mais ácido cítrico do que a cepa selvagem, obtendo uma concentração de  $88,73 \text{ g.L}^{-1}$ , bem superior ao encontrado neste trabalho.

#### 5.5.4 Cianeto

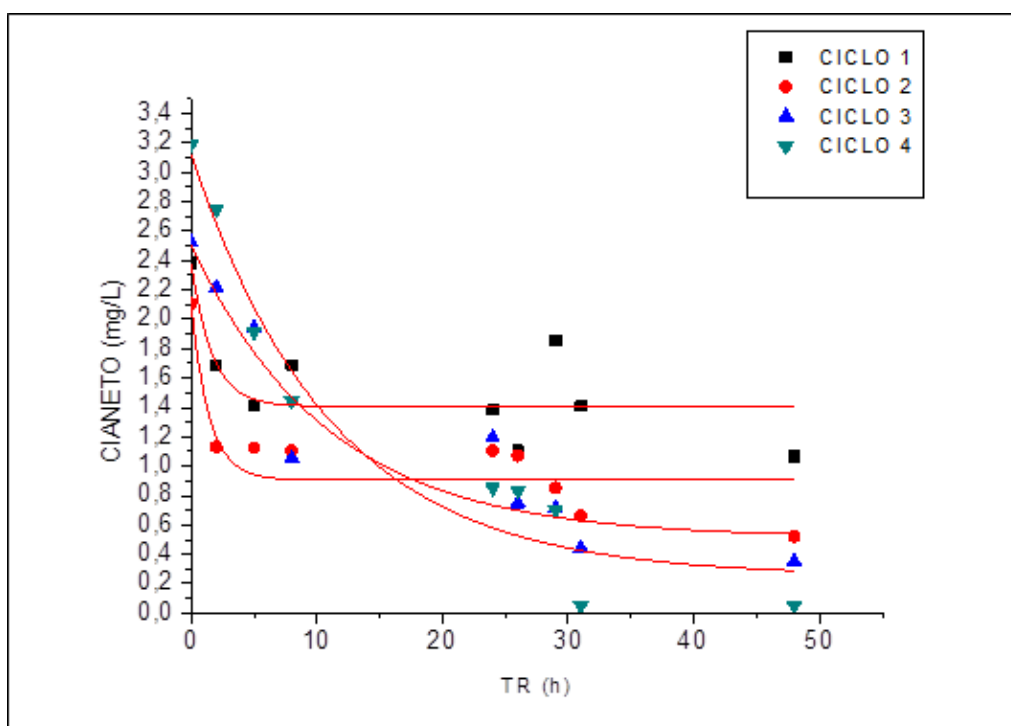
Analizando a Figura 33, a Figura 34 e a Tabela 11, percebeu-se que a melhor remoção de cianeto ocorreu no quarto ciclo, onde houve uma redução de 98,43%, portanto, superior ao melhor resultado da fase dispersa, de 96,5%. O valor da concentração final ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ) está abaixo dos padrões de lançamento de água residuárias de  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ . Neves *et al* (2014) obtiveram uma boa remoção de cianeto apenas a partir de 20 dias, tempo bem maior que o empregado neste estudo.

A remoção de cianeto encontrada neste trabalho demonstra ser mais eficiente quando comparada à encontrada na literatura utilizando outras formas de remoção de cianeto a partir de manipueira. Tem-se como exemplo o trabalho de Lied, Fagundes-Klen e Veit (2011), que em sua pesquisa, apresentaram remoção do íon cianeto de 3,48% a 13,04%, valores considerados baixos, utilizando o tratamento primário de coagulação/floculação com a *Moringa oleífera*, mostrando-se insuficiente para remoção de íon. Fazendo-se necessário um subsequente tratamento secundário que pudesse remover o íon cianeto do efluente gerado em feculárias.

Já Rebouças *et al.* (2015) utilizaram como meio de remoção do cianeto presente na manipueira um sistema solar, conhecido como concentrador solar do tipo linear, de seção parabólica, cilíndrico e articulado em apenas um eixo. Eles obtiveram que a concentração da manipueira ao final do processo no concentrador solar estudado reduziu em até 87,5 % em

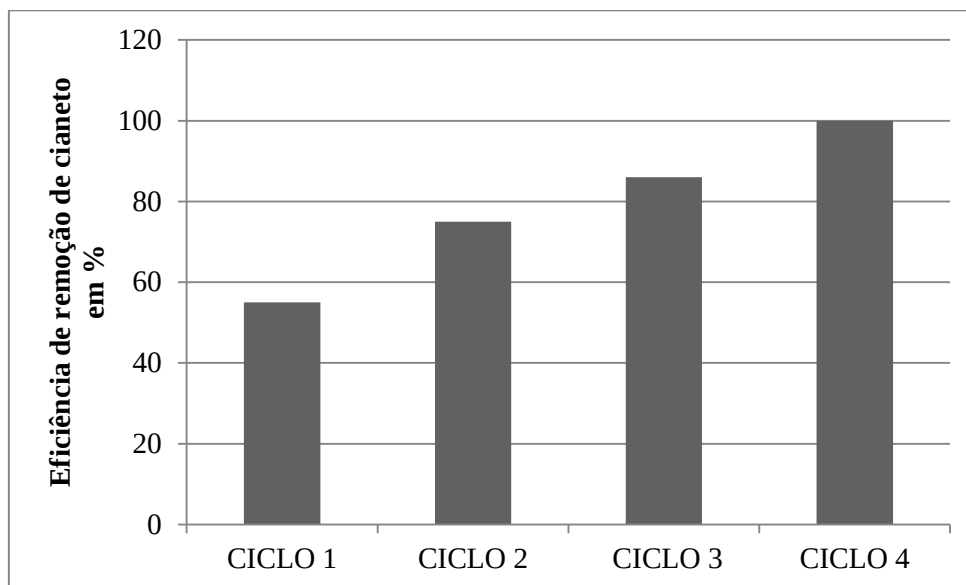
relação à concentração inicial, percentual de remoção mais próximo ao encontrado no presente trabalho, porém o valor de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  ou  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  ainda foram elevados para serem despejados nos rios e riachos, pois o CONAMA 430 (BRASIL, 2011), permite um valor máximo de cianeto de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ . Já o encontrado ao final deste trabalho ( $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ) está abaixo desse valor.

Figura 33- Cinética de decaimento e eficiência de remoção de cianeto nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

Figura 34- Eficiência de remoção de cianeto em % nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento.



Fonte: Autor (2015).

A partir da Tabela 11 é possível observar que o ciclo 4 possui o maior valor de  $R^2$  (0,9323), seguido pelos ciclos 3 (0,8713), ciclo 2 (0,7047) e ciclo 1 (0,5130). Os valores da constante de velocidade  $k$  aumentaram na ordem: ciclo 2 > ciclo 1 > ciclo 3 > ciclo 4.

As constantes de velocidades nos ciclos 1 e 2 são bem próximas, de 0,7012 a 0,6035, assim como entre os ciclos 3 e 4, de 0,0918 a 0,0902. Contudo a remoção de cianeto é crescente dos ciclos 1 ao ciclo 4, variando de 55 % à 100% de remoção.

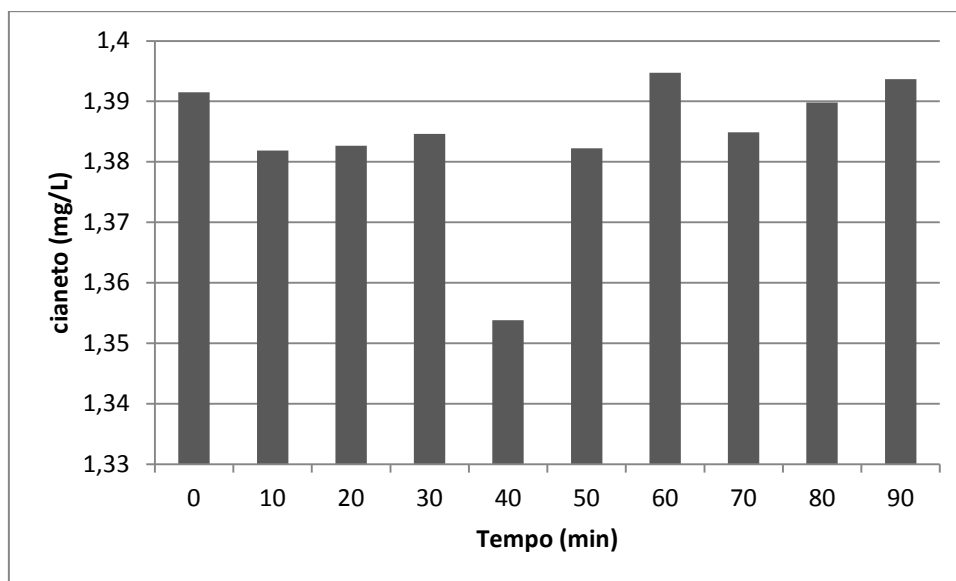
Tabela 11 - Cinética de decaimento e eficiência de remoção de cianeto nos reatores em batelada com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 durante quatro ciclos de 48h de experimento.

|         | <b>k (h<sup>-1</sup>)</b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>REMOÇÃO (%)</b> |
|---------|---------------------------|----------------------|--------------------|
| CICLO 1 | 0,6035                    | 0,5130               | 55                 |
| CICLO 2 | 0,7012                    | 0,7047               | 75                 |
| CICLO 3 | 0,0918                    | 0,8713               | 86                 |
| CICLO 4 | 0,0902                    | 0,9323               | 100                |

Fonte: Autor (2015).

O ensaio presente na Figura 35 mostra que não houve adsorção do cianeto ao meio suporte, pode-se perceber que existe uma constância nos valores de concentração do cianeto, com pouca oscilação. O que endossa que o a remoção do cianeto tenha ocorrido devido à atividade do fungo, ou seja, este o utilizou em seu metabolismo.

Figura 35 - Ensaio de adsorção do cianeto ao meio suporte.



Fonte: Autor (2016).

#### 5.5.5 Contagem de colônias

A contagem de bactérias e fungos foi realizada no final da operação do RBS, de modo que o valor médio do número de colônias, nas diluições de 1:10 e 1:1000, foi de  $2,5 \cdot 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> para os fungos e para as bactérias  $1,1 \cdot 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Os dados refletiram que a população fúngica foi maior do que a bacteriana, vale salientar que houve pouco tempo de operação da batelada com biomassa imobilizada. Como biodegradadores naturais, os fungos utilizam macromoléculas insolúveis e de grande peso molecular, como polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina e lipídios através da secreção de enzimas para o meio exterior. Assim, algumas características dos fungos filamentosos, como a bioatividade e o crescimento morfológico, os tornam potencialmente melhores degradadores do que as bactérias (MOLLEA, 2005).

Segundo More *et al.* (2010), os fungos comparados às bactérias possuem grande capacidade de ajustamento aos diversos tipos de meios, o que pode ter contribuído para crescimento fúngico superior ao crescimento bacteriano. O que é corroborado por Sankaran *et*

al. (2010), que relatam que os fungos são bastante superiores às bactérias, pois a biomassa produzida por estes possui um valor muito elevado, e também pode ser utilizado como fonte de proteína.

## 6 CONCLUSÕES

O fungo *Aspergillus niger* AN400 conseguiu crescer em todas as concentrações de manipueira, que foram de 5%, 10%, 25%, 50%, 70% e 100%, contudo houve retardo a esporulação.

A adição de sacarose não influenciou na produção de ácido cítrico, sendo o nitrogênio o fator mais relevante para um melhor rendimento.

Para os reatores com biomassa dispersa, não houve muita variação de pH, contudo, já na fase de biomassa imobilizada, o aumento do pH coincidiu com a maior eficiência de remoção de cianeto, porém a variação do PH não influenciou diretamente na produção de ácido cítrico.

A concentração de cianeto e de DQO do efluente final estão de acordo com os limites requeridos pela legislação brasileira, portanto a tecnologia estudada foi promissora na redução do potencial poluidor da manipueira.

## REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, S.; HAMED, M. **In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum***. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 78, 2013. p. 98-102.
- ADEOYE, A. O., LATEEF, A., GUEGUIM-KANA, E. B. **Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4(4), 2015. p. 568-574.
- AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. **Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar**. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 18, n. 1, 2000. p. 57-70.
- ALMEIDA, C. B. **Tratamento aeróbio, anaeróbio e misto de manipueira em reatores sob diferentes características**. 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005.
- AMARAL, L.; JAIGOBIND, A. G. A.; JAISINGH, S. **Dossiê Técnico: Processamento da Mandioca**. Paraná: TECPAR, 2007.
- ANDRADE, V. **Ácidos Orgânicos: Ácido Cítrico, Ácido Acético e Ácido Lático e sua importância na biotecnologia**, IV CONNEPI, Belém, 2009.
- ANDRADE, M. V. F. **Biodegradação de corante têxtil por uso de reator biológico em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium***. 109f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Fortaleza, Ceará, 2013.
- ANDREA, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRIS, D.; KOMAITISA, M.; PAPANIKOLAOU, S. **Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid**. Industrial Crops and Products. v. 31, 2010. p. 407–416.
- ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. **An overview of citric acid production**. Food Science and Technology, v.50, 2013. p.367-370. \_
- APHA, A. (2005). WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 2005. p21, 258-259.
- AUTA, H. S. *et al.*, **Citric acid production by *Aspergillus niger* cultivated on *Parkia biglobosa* fruit pulp**. International Scholarly Research Notices, v. 11, p. 1-8, 2014.
- BARANA, A. C. **Estudo de carga orgânica de manipueira na fase metanogênica de reator anaeróbio de fluxo ascendente e leito fixo**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas. Botucatu, 1995
- BARANA, A C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores**

**fase acidogênica e metanogênica.** Tese (Doutorado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. (Tese de Doutorado em PDF). Botucatu , 2000. 95f.

BARANA, A C. **Despoluição da manipueira e uso em fertilização do solo.** I Simpósio Nacional sobre a Manipueira. (Palestra durante o I Simpósio Nacional sobre a Manipueira). Vitória da Conquista-Bahia, 2008.

BARANA AC, LOPES DD, MARTINS TH, POZZI E, DAMIANOVIC MHRZ, DEL NERY V, FORESTI, E. **Nitrogen and organic matter removal in an intermittently aerated fixed-bed reactor for post-treatment of anaerobic effluent from a slaughterhouse wastewater treatment plant.** Journal of Environmental Chemical Engineering. 2013 Sep; 1(3):453-459, doi:10.1016/j.jece.2013.06.015.

BENNET, J.W. **Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology.** Journal of Biotechnolgy, New Orleans, v. 66, p. 101-107, 1998.

BETIKU, E., & ADESINA, O. A. **Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate.** Biomass and Bioenergy, 2013. p. 55, 350-354.

BLACKWELL, M. **The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?** American Journal of Botany, v. 98, 2001. p. 426–438.

BOLING-FRANKENBACH, S. D.; SNOW, J. L.; PARSONS, C. M.; BAKER, D. H. **The effect of citric acid on the calcium and phosphorus requirements of chicks fed corn-soybean meal diets.** Poultry Science, 2001. v.80, p. 783-788.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.** Brasília, 2011.

BUENO, J.F. **Influencia da paralisação escalonada da aeração na eficiência do tratamento aeróbio da manipueira em batelada.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2009.

CABELLO, C., CEREDA, M.P. **Produção de ácido cítrico por fermentação fúngica a partir de resíduos de mandioca: avaliando potencialidades.** In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 1989, p. 8. (artigo de anais).

CABELLO, C. **Avaliação do substrato manipueira na biossíntese de ácido cítrico monitorado por computador.** (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu – UNESP). Botucatu, 1991, 88 p.

CAMILI, E. A. **Tratamento da manipueira por processo de flotação sem uso de agentes químicos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007.

CARDOSO, E.; CARDOSO, D.; CRISTIANO, M.; SILVA, L.; BACK, A. J.; BERNADIM, A. M.; PAULA, M. M. S. **Use of Manihot esculenta crantz processing residue as biofertilizer in corn crops**. Research Journal of Agronomy, v.3, p.1-8, 2009.

CEPLAC – COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANTIO DA LAVOURA CACAUEIRA. **Culturas atendidas: mandioca**. Radar técnico. 2011. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/restrito/radar.asp>> Acesso em: 10, dez, 2015.

CEREDA, M.P. **A Industrialização da Mandioca no Brasil**. In: O uso da manipueira em Fertilização. Ed. Paulicéia. São Paulo, 1994.

CEREDA, M. P.; MATTOS, M.C.Y. **Linamarin: the toxic compound of cassava**. Journal of Venomous. Animals and Toxins, V. 2, n.1, p. 06-12. 1996.

CEREDA, M.P.; **Caracterização dos subprodutos da Industrialização da Mandioca**. In: CEREDA, M.P. Manejo, Uso e tratamento de subprodutos da Industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, . Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, V.4, cap.1, 2001. p.13-37.

CEZAR, V.R.S. **Uso prático dos biodigestores para produção de gás a partir da Manipueira**. Simpósio Nacional sobre a Manipueira. (Palestra durante o I Simpósio Nacional sobre a Manipueira). Vitória da Conquista-Bahia, 2008.

COLDEBELA, C. **Produção de ácido cítrico**. Toledo: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2009.

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

CORTÉS, S. A. D. J., MOSQUEDA, O. T. **Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundários de interés biotecnológico**. Revista Química Viva, 2013.p. 64- 90.

CREMONESE, E.B. **Aproveitamento de subprodutos oleoquímicos para produção de ácido orgânico por Aspergillus niger**. Dissertação (Mestrado em Gestão e Tecnologia Ambiental) Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, 2012.

DACERA, D.D.M; BABEL, S. **Removal of heavy metals from contaminated sewage sludge using Aspergillus niger fermented raw liquid from pineapple wastes**. Bioresource Technology, v. 99, n. 6, 2008, p. 1682-1689.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. **Compostos de aroma por Geotrichum fragans cultivado em manipueira**. In: CEREDA, M. P. (Ed.). Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v. 4, p. 96-106.

DASH R. R.; GAUR A.; BALOMAJUMDER C. **Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment**. Journal of Hazardous Materials, n.163, 2009 p.1-11.

DUARTE, A. S.; SILVA, E. F. F.; ROLIM, M. M.; FERREIRA, R. F. A. L.; MALHEIROS, S. M. M.; ALBUQUERQUE, F. S. **Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.16, p.262-267, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662012000300005>> Acesso em 20.07.2015

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. **Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances.** Nature, v. 28, n.3, p. 350 – 356, 1956.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. **Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase like compounds in wastewater and soil treatment: a review.** Applied Catalysis B: Environmental, Amsterdam, v. 28, p. 83-99, 2000.

EPSTEIN, J. **Estimation of microquantities of cyanide.** Analytical Chemistry 19.4 (1947): 272-274.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: Ed. Educs, 2004.

FAO. **FAO Statistical Yearbook 2013 – World food and agriculture.** Rome, 2013. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>> Acesso em 25.07.2015.

FERNANDES JR., A . **Digestão anaeróbia de manipueira com separação de fases: cinética da fase acidogênica.** Botucatu: UNESP/FCA, 1995.

FERREIRA, W. A.; BOTELHO, S. M.; CARDOSO, E. M. R.; POLTRONIERI, M. C.; **Manipueira: Um adubo Orgânico em Potencial.** Embrapa Amazônia Oriental, 21p. (Documentos nº 107). Belém, PA, 2001.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO JR., A. A.; PEIXOTO, A. L., WALTER, B. M. T., BICUDO, C., ZAPPI, D, COSTA, D. P., **Catálogo de plantas e fungos do Brasil,** Rio de Janeiro, 2010.

FREITAS, V.F.; CELY, M.V.T.; ANDRADE, G. **Germinação e crescimento do fungo micorrízico arbuscular Acaulospora sp. In vitro,** Synergismus scyentifica UTFPR, Pato Branco, 09 (1). Artigos convidados da III Reunião Paranaense de Ciência do Solo - III RPCS, Londrina - PR , 2014.

GIJZEN, HUUB J., ELISABETH B., HENRY F. **Cyanide toxicity and cyanide degradation in anaerobic wastewater treatment.** Water Research34.9 (2000): 2447-2454.

GLEADOW, R; MOLLER, B. **Cyanogenic Glycosides: Synthesis, Physiology, and Phenotypic Plasticity.** Annual Review of Plant Biology 65: 155-185, 2014.

GONÇALVES, A.C. **Tratamento de efluentes contendo cianeto livre através do sistema**

**H2O2/UV.** Rio de Janeiro: PUC-Rio, 2004. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais e Metalurgia), Departamento de Ciência Dos Materiais e Metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2004. p. 206.

GOMI, N., YOSHIDA, S., MATSUMOTO, K., OKUDOMI, M., KONNO, H., HISABORI, T., SUGANO, Y. **Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus Bjerkandera adusta dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products.** Biodegradation v.22, 2011. p. 1239–1245.

GOSH, P. Comprehensive review on citric acid fermentation. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 4, 2013. p. 890-914.

GUIMARÃES M. S. de O. **Coleta, isolamento e identificação de fungos presentes em sistemas de tratamento de efluentes de indústria petroquímica para utilização em processos degradação de hidrocarbonetos aromáticos.** Dissertação de mestrado em Engenharia Ambiental, área em Saneamento Ambiental – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

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

GRIMM, L. H., KELLY, S., KRULL, R., HEMPEL, D. C. **Morphology and productivity of filamentous fungi.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 69, 2005. p. 375-384.

GROXKO, M. **Análise da conjuntura agropecuária – Mandioca safra 2014/2015.** Secretaria de estado da agricultura e do abastecimento – Departamento de economia rural. Paraná, 2013. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca\\_2014\\_15.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2014_15.pdf)> Acesso em 25.07.2015

HALME, P; KOTHIAHO, J.S. **The importance of timing and number of surveys in fungal biodiversity research.** Biodiversity and Conservation, DOI 10.1007/s10531-011-0176-z, 2011.

(HANS) VAN LEEUWEN, J. H.; RASMUSSEN, M. L.; SANKARAN, S.; KOZA, C. R.; ERICKSON, D. T.; MITRA, D.; JIN, BO. **Fungal Treatment of Crop Processing Wastewaters with Value-Added Co-Products.** Sustainable Bioenergy and Bioproducts, 2012. p. 13-44.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. **Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals.** Nature Reviews - Microbiology, v. 9, 2011. p. 177-192.

HATAKKA A. **Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation.** FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 13, 2011. p. 125-135.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R., GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G., BERGMANN, C. W., LOERA-CORRAL, O., ROJO-DOMÍNGUEZ, A., HUERTA-OCHOA, S., PRADO-BARRAGÁN, L. A. **Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from Aspergillus fumigatus.** Process Biochemistry, v. 46, 2011. p. 2001– 2006.

HSIAO, N. W.; CHEN, Y.; KUAN, Y. C.; LEE, Y. C.; LEE, S. K.; CHAN, H. H.; KAO, C. H. **Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract**, *Peptidase R. Electronic J Biotechnol*, 2014. v. 17, p. 89-94.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, maio, 2015. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro v.29, n.5, p.1-76. 2015. Disponível em:<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/Is\\_pa\\_201505.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/Is_pa_201505.pdf)> Acesso em: 09 Agosto de 2015.

INOUE, K. R. A. **Produção de biogás, caracterização e aproveitamento agrícola do biofertilizante obtido na digestão da manipueira**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, 2008.

ISMAIL, I.; MONEM, N.A.; FATEEN, S.E.; ABDELAZEEM, W. **Treatment of a synthetic solution of galvanization effluent via the conversion of sodium cyanide into an insoluble safe complex**. *Journal of Hazardous Materials*, v.166, 2009. p.978–983.

JORGENSEN, K; MORANT, A; MORANT, M; JENSEN, N; OLSEN, C; KANNANGARA, R; MOTAWIA, M; MOLLER, B; BAK, S. **Biosynthesis of the Cyanogenic Glucosides Linamarin and Lotaustralin in Cassava: Isolation, Biochemical Characterization, and Expression Pattern of CYP71E7, the Oxime-Metabolizing Cytochrome P450 Enzyme**. *Plant Physiology*, 2011. p. 155: 282-292.

JURADO, M.; MARTINÉZ, A.T.; MARTINEZ, M.J.; SAPARRAT, M.C.N. **Application of White-rot fungi transformation, detoxification, or agriculture wastes, role of laccase in the processes**. *Comprehensive Biotechnology*, Amsterdam, v.6, 2011. p. 595-603.

KAAIJ, R. M. V. D. **Alpha-glucan acting enzymes in *Aspergillus niger*: Diversity in enzymatic activities end functions**. University of Groningen, 2007. Dissertação (mestrado). Disponível em: [https://www.rug.nl/research/portal/publications/pub\(6755f07a-09de-4f10-9561-7ea68c4a5014\).html](https://www.rug.nl/research/portal/publications/pub(6755f07a-09de-4f10-9561-7ea68c4a5014).html) . Acessado em 1 jun. 2015.

KANAGAWA, A. L.; NEVES, M. A. **Biologia e Sistemática de Fungos, Algas e Briófitas. Ciências Biológicas - Cadernos Cb Virtual 2**, 2011. p. 257- 306.

KANNANGARA, R; MOTAWIA, M; HANSEN, N; PAQUETTE, S; OLSEN, C; MOLLER, B; JORGENSEN, K. **Characterization and expression profile of two UDP-glucosyltransferases, UGT85K4 and UGT85K5, catalyzing the last step in cyanogenic glucoside biosynthesis in cassava**. *The Plant Journal*, 2011. p. 68: 287-301.

KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. 1<sup>a</sup> edition. New York: Wiley, 2005. p. 293.

KOLICHESKI, M. B.; SOCCOL, C. R. **Otimização do meio e condições de cultura na produção de ácido cítrico por fermentação submersa**. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 13, n. 2, 1995.

KYRIACOU, A., LASARIDI, K. E., KOTSOU, M., BALIS, C., & PILIDIS, G. **Combined bioremediation and advanced oxidation of green table olive processing wastewater.** *Process Biochemistry*, 40(3), 2005.p.1401-1408.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M., MELLONI, E., & SALAMINO, F. (2014). **I principi di biochimica di Lehninger.** Zanichelli.

LEITÃO, A. L. **Potential of Penicillium Species in the Bioremediation Field.** *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 6, 2009 . p. 1393-1417.

LEONEL, M.; HAMADA, C.; CEREDA, M. P. **Cultivo de *Aspergillus niger* em água residual de processamento de mandioca (manipueira).** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 16. Santos-SP, 1991. Anais..., 1991. p. 215.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.** *Scientia Agricola*, 52(2), 1995. p. 299-304.

LIED, E.B.; FAGUNDES-KLEN, M.R.; VEIT, M.T. **Avaliação da eficiência do tratamento de água residuárias de fecularia por coagulação/floculação utilizando extrato de *Moringa oleífera*.** II Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. Londrina-PR, 2011.

LIED, E. D. **Tratamento De Efluente Industrial de Fecularia Utilizando Macrófita Aquática *Eichhornia Crassipes* e Coagulante Natural.** Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química-Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo - PR, 2012. p. 131.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** Sao Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 3.

LIMA, R.A. **Tratamento de efluentes líquidos de unidades produtoras de farinha de mandioca.** Dissertação. Mestrado em desenvolvimento de processos ambientais. Universidade Católica de Pernambuco. Recife, 2010.

MAGALHÃES, C. P. **Estudos sobre as bases bioquímicas da toxicidade da manipueira a insetos, nematóides e fungos.** Dissertação de Mestrado no Centro de Ciências – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

MARIER, J.R. & BOULET, M. **Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method.** Division of Applied Biology, National Research Council, Ottawa, Canada. 1958.

MARINHO, G.; RODRIGUES, K.; **Fungos e Águas Residuárias Industriais: Nova Tecnologia.** Recife: Imprima, 2012.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental.** Jaguariúna: Embrapa – Meio Ambiente, v. 2, 2008. p. 304-319.

MENDONÇA-PINTO, P.H.; CABELLO, C. **Tratamento de manipueira de feijão em biodigestor anaeróbio para disposição em corpo receptor, rede pública ou uso em fertirrigação**. Revista Energia na Agricultura. Botucatu, 2011.

METCALF & EDDY (1991). **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse**. (3 th edition). Singapura: McGraw-Hill.

MINTER, D. W.; SILVA, M. **Website “Fungos do Brasil” (Fungi from Brazil)** [www.cybertruffle.org.uk/brazfung](http://www.cybertruffle.org.uk/brazfung), acessado em 25.07.2015.

MISHRA, B.K.; LATA, A.A. **Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger***. Bioresource Technology, 2004, v. 94, n. 1, p. 9-12.

MOHAMMAD, N.; ALAM, M. Z.; KABBASHI, N. A.; AHSAN, A. **Effective composting of oil palm industrial waste by filamentous fungi: A review**. Resources, Conservation and Recycling, 2012. p. 58. 69–78.

MOLLEA, C., BOSCO, F., RUGGERI, B. 2005. **Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies**. Chemosphere 60:636-643.

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

MOURA RB, DAMIANOVIC MHRZ, FORESTI E. **Nitrogen and carbon removal from synthetic wastewater in a vertical structured-bed reactor under intermittent aeration**. J. Environ. Manage. 2012 May. p. 98:163- 167, doi:10.1016/j.jenvman.2012.01.009.

MUKHERJEE, A.; DAS D.; MONDAL, S.K.; BISWAS, R; DAS, T.K. A , BOUJEDAINI, N; ANISUR R. KHUDA-BUKHSH, A.R. **Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation**. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 2010. p.172–182.

NADEEM, S., AHMED, I., MUTALIB, I. A., TUFAIL, M. E KHAN, M. S. (2014). **Citric Acid Future Prospects for Pakistan, a Short Review**. Applied Mechanics and Materials, 625, 61–64. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.625.61.

NEILSON, E; GOODGER, J; WOODROW, I; MØLLER, B. **Plant chemical defense: at what cost?** Trends in Plant Science 18, 2013 . p.250-258.

NEVES, O.S.C; SOUZA, A.S.; COSTA, M.A.; SOUSA L.A.; VIANA, A.E.S.; NEVES V.B.F. **Persistência do cianeto e estabilização do pH em manipueira**. Revista brasileira de tecnologia agroindustrial. Paraná-Brasil, 2014.

NOVAES, T.A. **Fungos no tratamento de manipueira**. Dissertação. Centro de Ciências de Exatas e Tecnologia, Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande - MS, 2011.

- PAPAGIANNI, M. **Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling**. Biotechnology Advances, v.25, 2007 . p. 244-263.
- PASSARINI, M. R. Z.; RODRIGUES, M. V. M.; SILVA, M.; SETTE, L. D. **Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation**. Marine Pollution Bulletin 62, 2011. p. 364–370.
- PASTORE, N.S.; HASAN, S.M.; ZEMPULSKI, D.A. **Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose**. Engevista, v. 13, n. 3, 2011.
- PENNA, T.C.V. **Produção de ácidos**. In: Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W.,Schidell, W. Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blucher, v.3, 2001. p. 45-50.
- PEREIRA Jr., Nei. (editor-autor) **Tecnologia de bioprocessos** / Nei Pereira Jr., Elba Pinto da Silva Bon, Maria Antonieta Ferrara. – Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. in. – Séries em Biotecnologia, V. 1
- PHAN, C-W.; SARABATNAM, V. **Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes**. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 96, n. 4, 2012. p. 863–873.
- PINTO, A.P.; SERRANO, C.; PIRES, T.; MESTRINHO, E.; DIAS, L.; TEIXEIRA, D. M.; CALDEIRA, A.T.; **Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures**. Science of the Total Environment, 2012. p. 435-436, p. 402-410.
- PINTO, P. H. M. **Tratamento de manipueira de fecularia em biodigestor anaeróbio para disposição em corpo receptor, rede pública ou uso em fertirrigação**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008.
- PONTE, J. J.. **Cassareep. An unconventional nematocide**. Cassava Newsletter, West Yorkshire, v 12, n.2, 1999. p. 9.
- POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. **Science-based bioprocess design for filamentous fungi**. Trends in Biotechnology, January, Vol. 31, No. 1, 2013. p. 37- 44.
- PRADO, F. C., VANDENBERGHE, L. P. D. S., & SOCCOL, C. R. **Relation between citric acid production by solid-state fermentation from cassava bagasse and respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in semi-pilot scale**. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48(SPE), 2005. p. 29-36.
- PRATA, A. M. R.; SANTOS, R. S. **Estudo da Obtenção de Ácido Cítrico por *Aspergillus niger* a partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto**. Faculdade de Engenharia Química de Lorena – Depto. de Biotecnologia –DEBIQ, 2005. Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos\\_completos/t325.doc](http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t325.doc)> Acessado em 10 jul. 2015.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos**. 6ª ed. v. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

ROCHA, V. F. **Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares**. Niterói: Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, 2009.

REBOUÇAS, C.S.; FREITAS, A.G.B.; BERY, C.C.S.; SILVA, I.P.; JÚNIOR, A.M.O.; SILVA, G.F. **Utilização de um sistema para a redução do ácido cianídrico presente na manipueira utilizando energia solar**. Revista GEINTEC – ISSN: 2237-0722. São Cristóvão/SE – v. 5/n. 1/ 2015. p. 1809-1819.

RIBEIRO, J. S.; NEVES, O. S. C.; SOUZA, A. S.; VIANA, A. E. S.; SANTOS, A. LIMA, D. H. N.; COSTA, M. A. **Determinação da composição química da manipueira produzida na microrregião de Vitória da Conquista-Ba**. Anais.. IV ENCONTRO DE QUÍMICA DA BAHIA. Barreiras, de 3 a 5 de setembro de 2010. CD-Rom.

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

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SAFFRAN, M., DENSTEDT, D.F. **A rapid method for determination of citric acid**. Journal of Biological.. Chemistry, V. 175, 1948.

SAMPAIO, G. M. M. S. **Remoção de metil paration e atrazina em reatores de bancada com fungos**. 2006. 113f. Tese (Doutorado em Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4th. ed. Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures baarn delft, 1995. p. 322.

SANATAN, P. T.; LOMATE, P. R.; GIRI, A. P.; HIVRALE, V. K. **Characterization of a chemostable serine alkaline protease from *Periplaneta americana***. BMC Biochemistry, 14:1-32, 2013.

SANT'ANNA Jr., G. **Tratamento Biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro. Ed. Interciência, 2010. p. 418.

SANTOS, C.F.C.; PASTORE, G.M.; DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P. **Produção de biosurfactantes por linhagens de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato**. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 33, 2000. p. 157-161.(artigo de revista impressa).

SANTOS, R. S. **Obtenção de ácido cítrico por fermentação submersa a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005. p. 63.

SANTOS, S. F. M. **Estudo para produção de pectinase por fermentação submersa em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SANKARAN, S., KHANAL, S. K., JASTI, N., JIN, B., POMETTO III, A. L., & VAN LEEUWEN, J. H. (2010). **Use of filamentous fungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: a review**. *Critical reviews in environmental science and technology*, 40(5), 400-449.

SATYANARAYANA, T.; RAO, J. L.; EZHILVANNAN, M.  **$\alpha$ -Amylases**. In: Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C. (Eds.), *Enzyme technology*. Springer, 2006. p. 189.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U., AQUARONE, E., & BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. 1.ed., São Paulo: Editora Edgard Blucher, v.2, 2001.

SHORE, J. **Colorants and Auxiliaries, v.1: Colorants**, 2nd Edition. SDC, Manchester, 2002a.

SIKANDER, A. **Studies on the submerged fermentation of citric acid by *Aspergillus niger* in stirred fermentor**. PhD thesis, University of the Punjab, Lahore. Paquistão, 2004.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. **Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C**. *Revista Brasileira Análises Clínicas*, São Paulo, v. 40, n. 1, 2008. p. 73-74.

SOCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S. E RODRIGUES, C. (2006). **New Perspectives for Citric Acid Production and Application**. *Food Technol. Biotechnol*, 44(2), 141–149. doi: 1330-9862.

SOLA, M.C; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade**. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.8, N.14; 2012. p. 1398.

SOLIS, M.; BUSTAMANTE, E.; SOLIS, A.; PEREZ, H.; MANJARREZ, N. **Comparison of the índigo carmine discoloration with two immobilization systems using chitosan as support and non purified enzymes**. In: SIMB Annual Meeting and Exhibition. Washington, 2012.

SOUZA, R. P., LIMA, A. M. F., PEZOTI, O., SANTANA, V. S., GIMENEZ, M. L., & FERNANDES-MACHADO, N. R. C. **Photodegradation of sugarcane vinasse: evaluation of the effect of vinasse pre-treatment and the crystalline phase of TiO<sub>2</sub>**, 2016. *Acta Scientiarum. Technology*, 38(2), 217-226.

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

SUN, J.; LU, X.; RINAS, U.; ZENG, A. P. **Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics.** *Genome Biology*, v. 8: R182, p. 1-13, 2007.

SUN, L.; WANB, S.; YU, Z.; WANGA, Y.; WANG, S. **Anaerobic biological ENGEVISTA, V. 16, n. 4, p. 431-447, Dezembro 2014 447 treatment of high strength cassava starch wastewater in a new type up-flow multistage anaerobic reactor.** *Bioresource Technology*, v. 104, 2012. p. 280–288.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 8ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 920.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2005.

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

TSILOYIANNIS, V. K.; KYRIAKIS, S. C.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K. **The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea.** *Research in Veterinary Science*, v.70, 2001. p. 287-293.

VASSILEV, N.; BACA, M. T.; VASSILEVA, M. **Plant lignocellulose and decomposition by fungi: from nature to industrial use.** *The Mycologist, Cambridge*, v. 8, 1994. p. 113-114.

VAULONT, S.; VASSEUR, M.; KAHAN, A. **Glucose regulation of gene transcription.** *Science*, v. 270, 2000. p. 484 – 487.

VELMURUNGAM, N.; HWANG, G.; SATHISHKUMAR M.; CHOI, T.K.; LEE, K.J.; OH, B.T.; LEE, Y.S. **Isolation, identification, Pb (II) biosorption isotherms and kinetics of a lead adsorbing *Penicillium* sp. MRF-1 from South Korean mine soil.** *Journal of Environmental sciences*, 22 (7), 1049-1056.

WAINWRIGHT, M; **Introducción a La biotecnología de los honos.** Zaragoza: Acribia, 1995.

WEIL, E. D. **Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology.** John Wiley, New York, v. 1, 2004. p. 976.

XIAO, P.; MORI, T.; KAMEI, I.; KIYOTA, H.; TAKAGI, K.; KONDO, R. **Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia*.** *Chemosphere* , v. 85, 2011. p. 218-224.

XU, D.B., MADRID, C.P., RÖHR, M., KUBICEK, C.P. **The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.30, p. 553-561, 1989 *apud* PASTORE, N.S.; HASAN, S.M.; ZEMPULSKI, D.A. **Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose.** *Engevista*, v. 13, n. 3, 2011.

XU, J., CHEN, Y. Q., ZHANG, H. J., BAO, J. W., TANG, L., WANG, K., ZHANG, J-H., CHEN X-S., MAO, Z. G. **Establishment and assessment of an integrated citric acid–methane production process**. Bioresource technology, 176, 121-128. 2015.

ZEN, C. K. *et al.* **Indução da síntese de lipídios e proteínas por *Aspergillus niger***. Revista CIATEC-UPF, v. 6, n. 2, 2014. p. 40-47.