

Biodegradação de paraquat e produção de celulase em reatores inoculados com fungos e resíduo lignocelulósico

Paraquat of biodegradation and cellulase production in reactors inoculated with fungi and waste lignocellulosic

- **Data de entrada:**
03/02/2017
- **Data de aprovação:**
11/07/2017

Glória Maria Marinho Silva/Gleycielle Cavalcante Pinheiro/Bárbara Chaves Aguiar Barbosa*/
Luciana José Ribeiro Pereira/Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa

DOI: 10.4322/dae.2018.013

Resumo

O uso abundante do herbicida Paraquat (PQT) tem causado muitos prejuízos ao ambiente devido seu potencial de bioacumulação. Outro problema ambiental é a grande quantidade de casca gerada no processamento da mandioca, lançada no ambiente sem disposição adequada. O objetivo deste trabalho foi avaliar simultaneamente a biodegradação fúngica do PQT e a produção fúngica de celulase a partir da casca de mandioca. O *Aspergillus niger* AN 400 foi utilizado em todos os testes, com tamanho de inóculo igual a 2×10^6 esporos.mL⁻¹. Reatores aerados em bateladas com fungo (RF) e sem fungo foram operados contendo solução de 30 mg L⁻¹ PQT (RFP), solução de Vishniac (1 mL L⁻¹), concentrações de casca de mandioca (RFPC) entre 0 e 3,0 g L⁻¹, sem glicose e com 0,5 g L⁻¹ de glicose (RFCG) e durante 168 horas. Os resultados mostraram que a taxa de decaimento do PQT se ajustou em modelo cinético de primeira ordem. As maiores eficiências de remoção de PQT (70%) e de DQO (78%) foram registradas no reator com fungo, glicose e 1,0 g de casca de mandioca-L⁻¹ (RFPCG 1,0). Quanto à produção de celulase total, a máxima registrada foi de 0,36 FPU mL⁻¹ no reator com fungo, 3,0 g de casca-L⁻¹ e glicose (RFPCG 3,0)

Palavras-chave: Biodegradação. Casca de mandioca. Celulase. Paraquat.

Abstract

The abundant use of the herbicide paraquat (PQT) has caused considerable damage to the environment due to its potential for bioaccumulation. Another environmental problem is the large amount of bark generated in cassava processing, released in the environment without adequate disposal. The objective of this work was to simultaneously evaluate the fungal biodegradation of MDT and fungal cellulase production from cassava husk. Aspergillus niger AN 400 was used in all tests, with inoculum size equal to 2×10^6 spores.mL⁻¹. Fungus-batch aerated and fungus-free reactors were operated containing 30 mg L⁻¹ PQT solution (RFP), Vishniac solution (1 mL L⁻¹), manioc peel concentrations (RFPC) between 0 and 3,0 g L⁻¹, without glucose and 0.5 g L⁻¹

Glória Maria Marinho Silva – Doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Professora efetiva do Departamento de Química e Meio Ambiente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE.

Gleycielle Cavalcante Pinheiro – Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE.

Bárbara Chaves Aguiar Barbosa – Doutora em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará. Professora efetiva do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão - IFMA.

Luciana José Ribeiro Pereira – Doutora em Biotecnologia Ambiental pela Universidade Tecnológica de Graz - Áustria. Pesquisadora do centro de tecnologia da Universidade do Minho - Portugal.

Kelly De Araújo Rodrigues Pessoa – Doutora em Hidráulica e Saneamento pela EESC-USP. Professora efetiva do Departamento de Química e Meio Ambiente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE.

*Endereço para correspondência: Av. 13 de Maio, 2.081. Tel.: (85) 3307-3750. E-mail: barbara.barbosa@ifma.edu.br.

glucose (RFPG) and for 168 hours. The results showed that the decay rate of the MDT was adjusted in a first-order kinetic model. The highest removal efficiencies of MDT (70%) and COD (78%) were recorded in the reactor with fungus, glucose and 1.0 g of manioc-bark-L⁻¹ (RFPCG 1.0). As for the total cellulase production, the maximum recorded was 0.36 FPU mL⁻¹ in the reactor with fungus, 3.0 g of shell-L⁻¹ and glucose (RFPCG 3,0).

Keywords: Biodegradation. Cassava husk. Cellulase. Paraquat.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação por agrotóxicos em ambientes aquáticos vem aumentando gradativamente e prejudicando os seres vivos que ali circundam. Devido à toxicidade e persistência desses poluentes no ambiente, a grande maioria possui alto potencial de bioacumulação na flora e na fauna aquática, o que possibilita a entrada desses contaminantes na cadeia alimentar, provocando prejuízos ao corpo d'água e à saúde pública (SOUZA, 2017).

O herbicida paraquat (Figura 1) é comumente empregado no controle de ervas daninhas, porém, quando em contato com o solo, é rapidamente absorvido e se liga fortemente à terra e à matéria orgânica se tornando biologicamente inerte, não podendo ser absorvido pelas raízes de plantas ou por outros organismos. O solo é capaz de absorver grandes quantidades de contaminantes sem sofrer muitas transformações. Entretanto, com o passar do tempo, essas transformações quase sempre são irreversíveis e os danos causados ao meio ambiente são de difícil recuperação (BRUZZAFERRO, 2016; CHIARELLO, 2017).

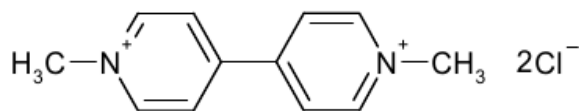


Figura 1 - Fórmula estrutural do herbicida paraquat.
Fonte: FAO (2003).

Outro problema ambiental bastante relevante é a grande quantidade de resíduos, tanto sólidos como líquidos, que são produzidos diariamen-

te por diversos setores agroindustriais. Em sua maioria, os resíduos agroindustriais possuem elevado potencial poluente e têm sua disposição final inadequada, levando à perda de biomassa e de nutrientes de alto valor (LAUFENBERG et al., 2003), tornando-se um passivo ambiental. No entanto, esses produtos podem também ter elevado potencial em processos de remediação de que são exemplo a adsorção de contaminantes (APOSTOL et al., 2010), suporte de micro-organismos (PENHA et al., 2016) e produção biológica de enzimas e outros produtos de valor acrescentado (MENEZES, 2006; DA CRUZ et al., 2015).

Durante o processamento industrial da mandioca são gerados resíduos sólidos (casca, entrecasca e bagaço) e líquidos, uma vez que o processo de extração da fécula de mandioca ainda carece de avanços tecnológicos (CAMARGO; LEONEL; MISCHAN, 2008). Nas fecularias, a casca da mandioca é gerada em grandes quantidades, cerca de 50 kg são resultantes do processamento de cada tonelada de mandioca (LEONEL; CEREDA, 2000). Logo, se a produção brasileira de mandioca na safra de 2015 foi de 24 milhões de toneladas, então a produção de casca foi de 1,2 milhões de toneladas.

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

lado, quando adicionado a esse processo, a casca de mandioca como resíduo lignocelulósico rico em celulose, esse fungo ainda é capaz de produzir enzimas de interesse comercial, como a celulase (MEKALA et al., 2008; STROPARO et al., 2012). A produção de enzimas é atribuída a sua capacidade de degradar diferentes substratos e por apresentar diversificado aparato enzimático (CHANDER; ARORA; BATH, 2004; CONCEIÇÃO, 2005; HARBHAJAN, 2006), promovendo assim a redução da carga poluidora do paraquat como também da casca de mandioca. Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de degradação fúngica do PQT e a produção de celulase do fungo *Aspergillus niger* AN 400 a partir da casca de mandioca via bateladas aeradas com biomassa dispersa.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Preparação da casca de mandioca

A mandioca utilizada foi doada pelo Centro de Ensino e Treinamento em Extensão (Cetrex). Inicialmente, 15 kg da planta amilácea foram lavados com água corrente para a remoção de terra. Após a lavagem, as raízes de mandioca foram descascadas e as cascas foram trituradas em liquidificador (marca BRITÂNIA). Nessa etapa, foram obtidos 8,45 kg de mandioca descascadas, 6,25 L de manipueira e 300 g de casca de mandioca úmida. Posteriormente, foi realizada a secagem das cascas em estufa (marca QUIMIS) a 60°C por 24 horas, obtendo-se 206 g de casca de mandioca seca, que foram acondicionados em local seco e em temperatura ambiente.

2.2 Cultivo, produção e contagem dos esporos

A espécie em estudo foi *Aspergillus niger* AN 400 sob a forma de suspensão de esporos, fornecida pelo Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM). Na preparação do inóculo foi realizada a produção de suspensão de esporos com a semeadura da espécie em placas de Petri esterilizadas contendo 15 mL de

meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Ágar*). O meio foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos. As placas inoculadas com fungos permaneceram por sete dias em estufa microbiológica (marca BIOPAR) à temperatura de $\pm 28^\circ\text{C}$. Ao final desse período foi observado o crescimento dos esporos por toda a placa. Posteriormente procedeu-se a remoção dos esporos com solução salina, Tween 80 e água destilada estéril com o auxílio da alça de Drigalsky. Para a contagem dos esporos foi preparada uma solução utilizando 50 μL da suspensão de esporos, previamente agitada em agitador tipo Vórtex, acrescida de 950 μL de solução Tween 80. Em seguida, foram transferidos 20 μL da solução preparada para uma câmara de Neubauer, onde se deu o procedimento de contagem dos esporos em microscópio óptico (marca BIOVAL) com aumento de 400 vezes (SAMPAIO, 2005).

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

Foram montados reatores de 2,5 L (volume útil) contendo concentrações constantes de paraquat (30 mg L^{-1}), solução de Vishniac (1 mL L^{-1}), tamanho de inóculo 2×10^6 esporos mL^{-1} e variando a concentração de casca de mandioca (0 - 3,0 g L^{-1}) e glicose (0 - 0,5 g L^{-1}) para avaliar a degradação do PQT pelo fungo *Aspergillus niger* AN 400 e a produção de celulase no mesmo reator. Os tempos reacionais (TR) analisados foram 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48, 72, 144 e 168 horas. Foram realizadas 4 bateladas distintas compostas por 7 reatores com fungo e 7 reatores sem fungo com as mesmas condições, totalizando 14 tipos de reatores variando a concentração da casca de mandioca e a presença de glicose na concentração de 1 g L^{-1} , conforme apresentado na Tabela 1.

A casca de mandioca e a água com solução de Vishniac foram autoclavados separadamente a 1,0 atm sob temperatura de 121°C por 20 minutos. Em seguida, misturou-se a casca, a água, adi-

cionou-se o paraquat e inoculou-se os reatores. Para cada TR estudado foram coletadas alíquotas de 15 mL de cada reator para a realização das análises de concentração de paraquat, demanda química de oxigênio (DQO) solúvel, pH, atividade de celulase total e sólidos suspensos voláteis (SSV).

Tabela 1 – Composição dos reatores nas bateladas realizadas no decorrer do estudo.

Tipo de reator com fungo	Composição	Tipo de reator controle	Composição
RFP	Fungo e PQT	RP	PQT
RFPC 0,5	Fungo, PQT e 0,5 g de casca de mandioca.	RPC 0,5	PQT e 0,5 g de casca de mandioca.
RFPCG 0,5	Fungo, PQT, 0,5 g de casca de mandioca e 0,5 g de glicose.	RPCG 0,5	PQT, 0,5 g de casca de mandioca e 0,5 g de glicose.
RFPC 1,0	Fungo, PQT e 1,0 g de casca de mandioca.	RPC 1,0	PQT e 1,0 g de casca de mandioca.
RFPCG 1,0	Fungo, PQT, 1,0 g de casca de mandioca e 1,0 g de glicose.	RPCG 1,0	PQT, 1,0 g de casca de mandioca e 1,0 g de glicose.
RFPC 3,0	Fungo, PQT e 3,0 g de casca de mandioca.	RPC 3,0	PQT e 3,0 g de casca de mandioca.
RFPCG 3,0	Fungo, PQT, 3,0 g de casca de mandioca e 3,0 g de glicose.	RPCG 3,0	PQT, 3,0 g de casca de mandioca e 3,0 g de glicose.

2.4 Métodos analíticos

As análises de pH, DQO e SSV foram realizadas conforme descrito por APHA (2005). A concentração de PQT foi determinada conforme o método descrito na Norma *AO AC Official Method 969,09 Paraquat in Pesticide Formulations* de 2000, configurada por meio da reação entre o ditonito de sódio 1%, preparado em solução de hidróxido de sódio 0,1 mol⁻¹L e o paraquat contido na amostra. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Thermo Scientific (marca Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer) em comprimento de onda de 600 nm. Com base nos resultados de remoção do PQT, realizou-se a modelagem cinética de decaimento do PQT ajustada ao modelo de primeira ordem descrito por Von Sperling (2005).

Foram realizados ensaios de adsorção de PQT na casca de mandioca para quantificar a massa de PQT adsorvida na casca. Utilizaram-se 3 frascos de vidro (4 L de volume útil), nos quais cada frasco continha 0,5, 1,0 e 3,0 g de casca de mandioca L⁻¹ e 30 mg L⁻¹ de PQT. A capacidade máxima de adsorção de PQT na casca foi monitorada a partir de sua concentração inicial e final no reator durante um período de 35 minutos (min), obtendo alíquotas nos tempos 0, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 min, conforme descrito por Da Silva (2015).

O processo de extração das enzimas foi realizado por filtração a vácuo em filtro Milipore com membrana de fibra de vidro 47 mm de diâmetro (marca AXIVA). As alíquotas filtradas foram conservadas a 4°C e utilizadas na determinação da atividade da celulase total, a qual foi realizada de acordo com o método descrito por Miller (1959), reportado por Ghose (1987), que se baseia na medição da dosagem de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 com dimensões de 1 cm x 6 cm a partir das enzimas presentes no extrato enzimático. Em tubos de ensaio (25 mL de volume útil) foram adicionados 1 mL de solução tampão citrato de sódio (pH 4,8 e 0,05 M), 0,5 mL de extrato enzimático e uma tira de papel de filtro. Para o branco total, o extrato enzimático foi substituído por 0,5 mL de tampão. Para o branco da enzima, adicionou-se 1 mL de tampão e 0,5 mL de extrato sem a presença da tira de papel filtro. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa microbiológica a 50°C por 60 min. Após a incubação, adicionou-se 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em cada tubo e levou-os ao banho-maria a 100°C por 5 min. Após a interrupção da reação com um banho de água fria, adicionaram-se 20 mL de água destilada, que foram homogeneizados, e após 20 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro Thermo Scientific (marca Evolution 60S UV - Visible Spectrophotometer) em comprimento de onda de 540 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Biodegradação fúngica de paraquat

A cinética de decaimento do PQT ajustou-se a um modelo de primeira ordem (Figura 2), e os percentuais de remoção de PQT nos reatores com as con-

centrações de 0 - 3,0 g de casca de mandioca L⁻¹ com fungo e sem fungo, no período de 168 horas, são apresentados na Tabela 2. A máxima eficiência foi de 70% (9,11 mg.L⁻¹ de PQT) para o RFPCG 1,0, após 168 horas de operação.

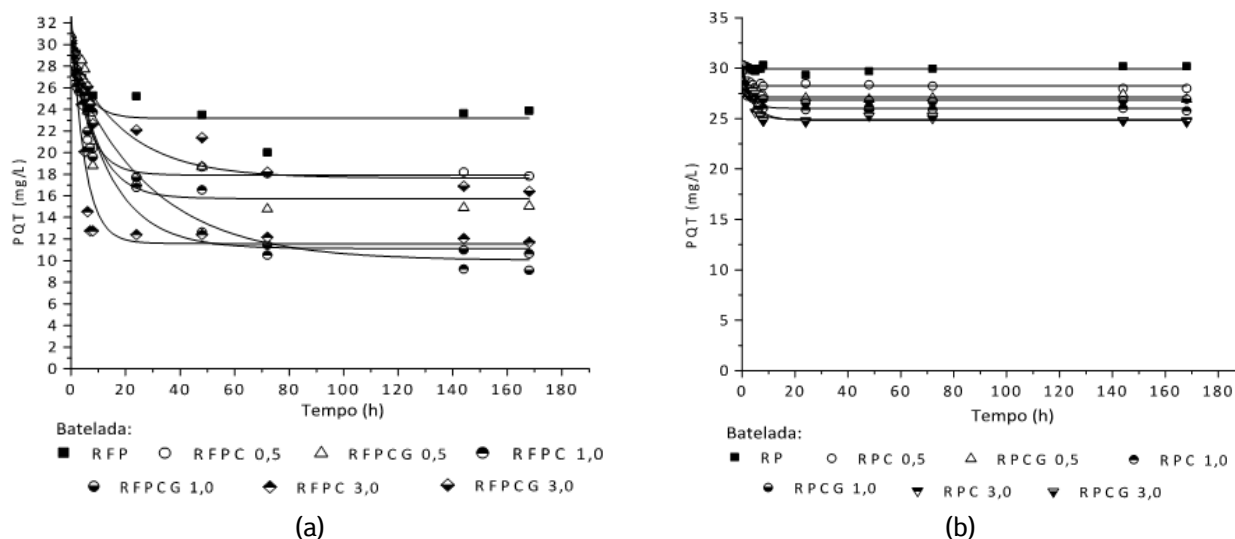


Figura 2 – Cinética de decaimento do PQT ajustada em modelo de primeira ordem nos reatores com fungo (a) e nos reatores controle (b). Legenda: RP - reator sem fungo, com PQT; RFP - reator com fungo e PQT; RFPC - reator com fungo, PQT e casca; RPC - reator sem fungo, com PQT e casca; RFPCG – reator com fungo, PQT, casca e glicose (0,5 g.L⁻¹).
Fonte: Autores (2017).

Tabela 2 – Velocidade de consumo do PQT e valores do R² dos reatores com fungo.

Reatores	k (h ⁻¹)	R ²	Eficiência remoção (%)
RFP	0,1854	0,7809	20
RFPC 0,5	0,1567	0,9038	40
RFPC 1,0	0,0333	0,9664	64
RFPC 3,0	0,2051	0,8753	61
RFPCG 0,5	0,1172	0,8758	51
RFPCG 1,0	0,0694	0,9488	70
RFPCG 3,0	0,0479	0,9050	46

A título de exemplo, Kopytko et al. (2002) estudaram a degradação de PQT em bateladas com biomassa de bactérias *Pseudomonas putida* imobilizada em gel de alginato de cálcio e encontraram eficiências de degradação entre 48% e 95% após a adição de carvão ativado e glicose 1 g L⁻¹ no reator, mostrando que a presença de glicose pro-

moveu maior eficiência, assim como encontrado na presente pesquisa. Da Silva (2015) reportou eficiência máxima em reatores com glicose 44% de remoção máxima de PQT no reator com glicose 0,5 g L⁻¹, no 30º dia de operação, utilizando reatores em bateladas aeradas com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400, sendo esse percentual inferior ao dessa pesquisa.

O RFPC 1,0 apresentou eficiência máxima de 69% em 144 horas, valor bastante próximo do reator com as mesmas condições contendo glicose (RFP-CG 1,0). Desse modo, pode-se observar que, ao final da operação, a presença do cossustrato nesse reator parece não ter sido determinante para atingir uma máxima eficiência de degradação de PQT (70%), o que pode tornar o sistema RFPC 1,0

economicamente mais viável. Quanto à influência da concentração de casca de mandioca na biodegradação de PQT, a eficiência do processo foi melhor com maior concentração de casca e quando adicionou-se glicose, porém, os reatores RFPC 3,0 e RFPCG 3,0 apresentaram eficiências menores (61 e 46%, respectivamente) quando comparados com os reatores RFPC 1,0 (69%) e RFPCG 1,0 (70,3%) e permaneceram constantes a partir de 72 horas. Isso ocorreu, provavelmente, devido à saturação do sistema em vista da maior quantidade de matéria orgânica disponível, fato observado também por Royer (2008).

Tastan; Donmez (2015) investigaram a biodegradação do pesticida triclosan por *Aspergillus versicolor* e registraram 61,92% de remoção máxima do poluente no 5º dia de experimento com concentração inicial de 7,5 mg L⁻¹ de pesticida, enquanto na presente pesquisa foi alcançado 64,61% com concentração inicial de 30 mg L⁻¹ de PQT após apenas 3 dias de operação, o que evidencia que o *Aspergillus niger* AN 400, na condição do presente estudo, apresentou-se eficiente.

Os ensaios de adsorção de PQT na casca de mandioca realizados com as concentrações de 0,5, 1,0 e 3,0 g L⁻¹ foram desenvolvidos, e encontraram-se as seguintes massas de pesticida adsorvido por grama de casca: 0,0064 g g⁻¹ (10,6%), 0,0066 g g⁻¹ (22%), 0,0036 g g⁻¹ (33%), respectivamente. Como o reator RFPCG 1,0 removeu 70% de PQT, isso significa que apenas 22% da massa total presente no reator foi adsorvida na casca de mandioca e o restante (48%), resultou da degradação biológica dos fungos.

As constantes de velocidade de decaimento do PQT em diferentes concentrações de casca de mandioca seguiram um modelo de primeira ordem. A maior velocidade de remoção de PQT (2,19 h⁻¹) ocorreu no reator sem fungo RPC 0,5, evidenciando a predominância de adsorção, a qual se caracteriza por ser um processo mais rápido que o de degradação. Pode-se inferir, também, que a maior velocidade nesse reator deveu-se também à saturação da casca que se deu mais rapidamente quando houve menor concentração desse resíduo. Nos reatores com fungo, a maior velocidade (0,21 h⁻¹) foi registrada no RFPC 3,0, provavelmente devido ao processo de adsorção inicial seguido de degradação com remoção de PQT de 60%, após 168 horas. Vale ressaltar, porém, que o reator de maior eficiência (RFPCG 1,0; 70%), no caso com fungo, não foi o de maior velocidade. Tal condição permite inferir que a utilização conjunta do adsorvente (no caso a casca de mandioca) com biomassa fúngica proporcionou melhor resposta ao longo das 168 horas.

Na Figura 3 está apresentada a cinética de decaimento de matéria orgânica carbonácea ajustada em um modelo de primeira ordem. Observou-se que a máxima eficiência ocorreu no RFPCG 1,0 (78%), após 168 horas. Conforme relatado por El-Rahim et al. (2009), as melhores eficiências registradas nos ensaios com glicose podem ser explicadas pela disponibilidade de substrato de fácil assimilação pelos fungos em meio a moléculas de estruturas complexas, o que de acordo com Singh (2006), a glicose ao ser utilizada como cossustrato gera subprodutos muito mais reativos que o pesticida, que reagem com o poluente gerando compostos passíveis de serem metabolizados, ao longo do tempo, pelas enzimas produzidas pelo micro-organismo.

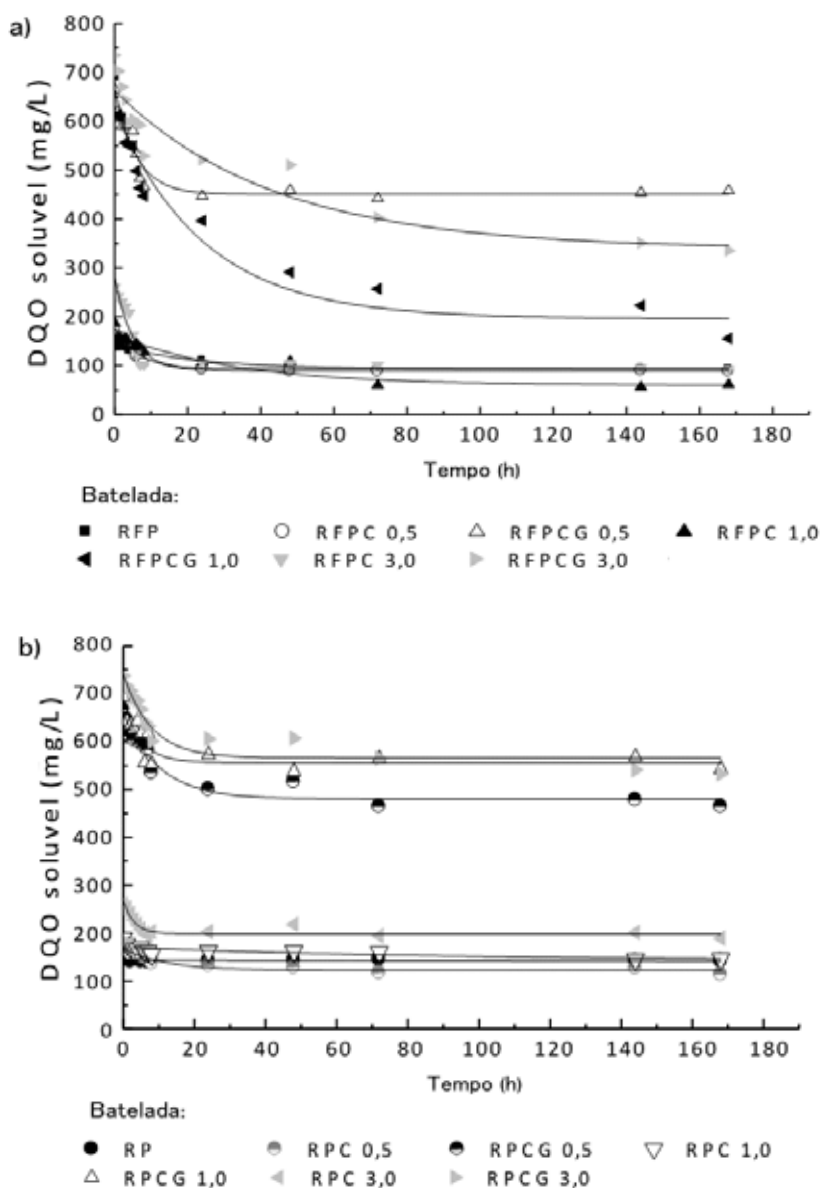


Figura 3 – Cinética da variação de DQO solúvel nos reatores com fungo (a) e sem fungo (b) com concentrações de 0,5, 1,0 e 3,0 g L⁻¹ de casca de mandioca e 30 mg/L de paraquat em 168 horas de operação.

Observou-se que nas primeiras 6 horas de experimento, o RFPC 3,0 se destacou dos demais reatores e alcançou cerca de 52,3% de eficiência de DQO, enquanto os outros apresentaram uma eficiência em torno de 28,4%. O mesmo reator, porém, com adição de glicose (RFPCG 3,0) obteve menor eficiência (18,7%) nesse mesmo período. Isso ocorreu, possivelmente, devido à não metabolização do PQT nesse período, uma vez que o fungo teria utilizado a glicose

como fonte primária de carbono, o que também foi observado por Da Silva (2015). Os autores Ali et al. (2008) e Ikeda et al. (2006) explicam que os reatores com glicose, em curtos períodos, podem apresentar baixa eficiência de DQO devido ao processo de degradação do cossustrato resultar na síntese de subprodutos que são contabilizados nos valores de DQO antes de reagirem com o poluente. Entretanto, a concentração ótima de glicose a ser empregada depen-

de de alguns fatores, como a espécie fúngica inoculada, a estrutura molecular do poluente, o regime de operação do reator, entre outros (SINGH, 2006).

As concentrações de SSV foram avaliadas no início (0 horas) e no final da operação (168 horas). Com base nos resultados, a diferença dos valores de SSV nos reatores sem fungo foi muito baixa, tendendo a zero, mostrando que não houve crescimento fúngico no meio. A eficiência máxima de SSV encontrada foi no RFPCG 3,0 com 37,81%, seguido do RFPCG 1,0 com 28,11%, ambos com a presença de glicose, carboidrato de fácil assimilação e fundamental para o desenvolvimento dos micro-organismos. Na Figura 4 é possível afirmar visualmente que no RFPCG 1,0 o meio encontra-se mais clarificado comparado ao RFPCG 3,0, o que é bastante coerente, pois naquele reator se registrou a maior eficiência de remoção de PQT e DQO. Os autores Kyriacou et al. (2005) afirmaram que o aumento da concentração de SSV está relacionado com a disponibilidade de matéria orgânica e nutrientes essenciais ao desenvolvimento dos fungos, resultando em um melhor polimento da água residuária, como visualizado nessa pesquisa.



Figura 4 – Crescimento de *Aspergillus niger* AN 400 nos reatores, após 168 horas, com concentração de 1,0 e 3,0 g/L de casca de mandioca adicionados de 0,5 g/L de glicose, inoculados com 2×10^6 esporos/mL, 30 mg/L de paraquat e 1 mL/L de Vishniac.

Fonte: Autores (2017).

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

Os valores de pH também foram registrados nos reatores estudados nessa pesquisa. Com base nos resultados, os reatores sem fungo não apresentaram mudanças bruscas de pH, o qual variou de 5,60 a 7,79, porém verificou-se uma grande redução desse parâmetro no reator com fungo RFPCG 1,0 que variou de 6,85 para 2,34. No período de 48 horas, registrou-se o início da diminuição do pH (3,6) e os valores foram se reduzindo até chegar a 2,34 no último dia de operação, o que indica a rápida adaptação dos fungos ao meio, o início da atividade metabólica e a formação de ácidos orgânicos decorrentes do metabolismo fúngico a partir da oxidação da matéria orgânica presente (Damascono et al., 2003; Esposito; Azevedo, 2004), o que refletiu na maior eficiência de remoção do PQT também registrada nesse reator. De acordo com Griffin (1994), a faixa ideal de crescimento fúngico é entre 4,0 e 7,0, porém esses micro-organismos suportam condições de extrema acidez e basicidade com pH entre 2,0 e 9,0. Da Silva (2015) também registrou uma transição do pH básico para o ácido variando de 7,2 para 3,1, no qual obteve maior degradação biológica de paraquat.

O perfil da atividade de celulase total por *Aspergillus niger* AN 400 está apresentado na Figura 5, na qual observaram-se os maiores valores de produção enzimática, que foi nos reatores com fungo e glicose, variando de 0,137 a 0,360 FPU.mL⁻¹, que se deu no RFPCG 3,0, com maior concentração de casca, em pH= 5,52, após 168 horas de operação. Esse fato já era esperado devido à maior quantidade de celulose (casca) para induzir a produção de celulase. Nos

reatores com fungo sem glicose, os valores máximos de atividade de celulase total variaram de 0,054 a 0,106 FPU.mL⁻¹. Tal fato decorre da capacidade dos fungos crescerem rapidamente quando há disponi-

bilidade de fontes de carbono (como glicose) produzindo, como resultado do metabolismo, enzimas extracelulares mediante presença de concentrações adequadas de nutrientes (KHELIFI et al. 2009).

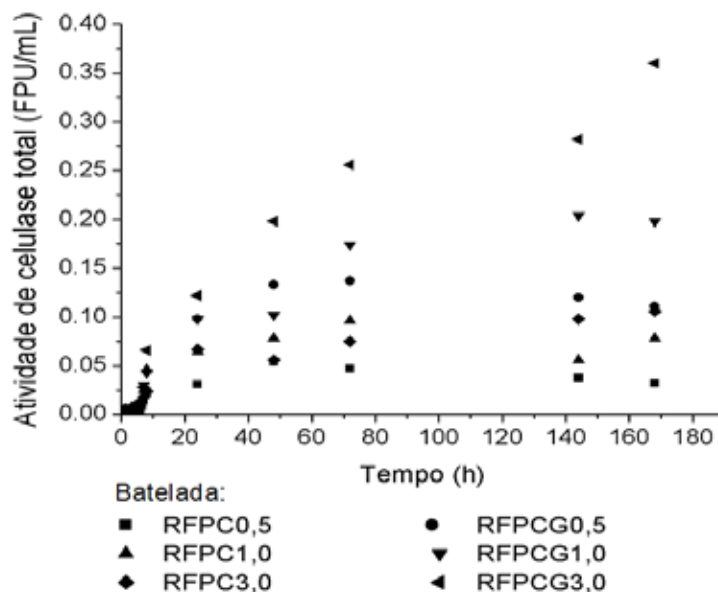


Figura 5 - Valores de atividade de celulase total nas bateladas com fungo, paraquat e casca de mandioca nas concentrações 0,5, 1,0 e 3,0 g/L, no período de 168 horas. Legenda: RFPC - reator com fungo, paraquat e casca de mandioca; RFPCG – reator com fungo, paraquat, casca de mandioca e 0,5 g/L de glicose.

Fonte: Autores (2017).

No trabalho de Basso; Gallo; Basso (2010), a produção de celulase total máxima encontrada nos ensaios com bagaço de cana-de-açúcar utilizando o fungo *Trichoderma reesei* QM9414 foi de 0,16 FPU.mL⁻¹ após 10 dias de fermentação, valor inferior ao registrado nesta pesquisa, cujo substrato foi a casca de mandioca, além de ainda contar com a presença de PQT nos reatores. Khan et al. (2007) também apresentaram valores menores, comparados à presente pesquisa, e alcançaram 0,10 FPU.mL⁻¹ como a máxima atividade de celulase total a partir da palha de arroz como substrato, utilizando diversas espécies de *Trichoderma* como inóculo, após 8 dias de cultivo. Aguiar; Menezes (2000) estudaram a produção de celulase total a

partir de bagaço não tratado pela linhagem *Aspergillus niger* IZ-9 e registraram valores máximos de 0,08 UI.mL⁻¹ em 7 dias de cultivo submerso sob agitação. Omojasola; Jilani (2008) também inocularam *Aspergillus niger* e alcançaram valores máximos de 1,58 FPU.mL⁻¹ em ensaios de fermentação a partir de polpa cítrica como fonte de carbono. No entanto, Wen et al. (2005) utilizaram *Trichoderma reesei* e bagaço não tratado e atingiram a máxima atividade de celulase total (0,30 U.mL⁻¹) depois de 6 dias de fermentação, valor semelhante ao obtido no presente trabalho.

Sun; Cheng (2002) utilizaram a palha de arroz como substrato indutor de celulase. O material foi pré-tratado com hidróxido de sódio 10%, e eles

encontraram uma produção máxima de 1,07 FPU. mL⁻¹ para o *Trichoderma reesei* RUT-C30. No entanto, o substrato utilizado na presente pesquisa, a casca de mandioca, foi utilizado sem qualquer tipo de pré-tratamento físico-químico, o que provavelmente implicou em valores inferiores aos encontrados por Sun; Cheng (2002), uma vez que o pré-tratamento com hidróxido de sódio no material lignocelulósico tem como objetivo remover parcial ou totalmente a lignina que atua como barreira ao ataque microbiano à celulose (CANETTIERI et al., 2004).

De acordo com Underklofer; Barton; Rennert (1958), as quantidades e as características físico-químicas de cada enzima produzida podem variar consideravelmente entre espécies e até mesmo entre linhagens da mesma espécie.

Analisando as condições dos reatores que apresentaram as melhores eficiências de remoção de PQT e DQO, o RFPCG 1,0 foi o mais eficaz em ambas as situações. Para a produção de celulase total, o RFPCG 3,0 apresentou melhor atividade enzimática. Isso se deveu, provavelmente, devido à maior quantidade de casca de mandioca no último reator, uma vez que a produção de celulase aumentou de acordo com o aumento da concentração de casca.

4 CONCLUSÃO

De modo geral, a proposta da pesquisa mostrou-se promissora, pois foi capaz de remover paraquat e DQO, além de produzir celulase a partir de resíduo lignocelulósico nos reatores inoculados com *Aspergillus niger* AN 400, contribuindo, dessa forma, para a redução da carga poluidora da casca de mandioca e do pesticida paraquat.

As eficiências de remoção de PQT aumentaram gradativamente à medida que aumentou-se a concentração de casca de mandioca e adicionou-se glicose; porém, o reator com maior quantidade

de de casca (RFPC 3,0 e RFPCG 3,0) apresentou eficiências constantes a partir de 72 horas, devido à saturação do processo em vista da maior quantidade de matéria orgânica.

As melhores eficiências de remoção de PQT e de DQO solúvel foram de 70 e 78%, respectivamente, no RFPCG 1,0. O mesmo reator sem adição de cossustrato (RFPC 1,0), porém, apresentou eficiências de 69% de remoção de PQT e 70% de remoção de DQO, o que tornou esse processo economicamente mais viável, uma vez que a glicose não influenciou melhorando esses percentuais.

A maior velocidade de remoção de PQT ocorreu no reator sem fungo RPC 0,5, evidenciando a predominância de adsorção, que se caracteriza por ser um processo mais rápido que o de degradação. Nos reatores com fungo, a maior velocidade foi registrada no reator RFPC 3,0, provavelmente devido ao processo de adsorção inicial seguido de degradação com remoção de PQT de 60%, após 168 horas.

Quanto à produção de celulase total, o reator RFPCG 3,0 apresentou a melhor atividade enzimática, com 0,36 FPU.mL⁻¹ após 168 horas, evidenciando assim a influência positiva da concentração de casca de mandioca e da presença de glicose na eficiência do processo.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanasas por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.
- ALI, N.; LUTFULLAH, G.; HAMEED, A.; AHMED, S. Decolorization of acid red 151 by *Aspergillus niger* SA1 under diferente physicochemical conditions. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1099-1105, 2008.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 21th ed. Washington: APHA, 2005.
- ANDRADE, M. V. F. **Biodegradação de corante têxtil por uso de reator biológico em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de *Phanerochaete chrysosporium***. Dissertação de mestrado, Instituto Federal do Ceará – IFCE, Fortaleza, CE, 95 p., 2013.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official Methods 969.09: **Paraquat in pesticide formulations (spectrophotometric method), official methods of analysis of AOAC International**. 17^a ed. Arlington, USA, 2000.

APOSTOL, L.C.; PEREIRA, L.; ALVES, M.M.; GAVRILESCU, M. Agro waste used as natural sorbents for acid red 51 uptakes. **ICAMS 2010 - Proceedings of the 3rd International Conference on Advanced Materials and Systems**. Bucharest, Romania, 16-18 Sep, 356-356, 2010.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 45, p. 1282-1289, 2010.

BRITTO, F. B.; VASCO, A. N.; PEREIRA, A. P. S.; MÉLLO JÚNIOR, A. V.; NOGUEIRA, L. C. Herbicidas no alto Rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 390-398, 2012.

BRUZAFERRO, M.; SANTOS, J. B. A. dos; BRITO, S. C.; NUNEZ, M. C. T.; RANGEL, J. A. Análise do uso de agrotóxicos em espaços de rizicultura: um estudo de caso no município de Caçapava, Sp. **Revista Univap**, São José dos Campos, v. 22, n. 40, Edição Especial, 2016.

CAMARGO K. F.; LEONEL M.; MISCHAN M. M. Produção de biscoitos extrusados de polvilho azedo com fibras: efeito de parâmetros operacionais sobre as propriedades físicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 586-591, 2008.

CANETTI, E. V. **Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, SP, p. 145, 2004.

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

CHIARELLO, M. et al. Determination of pesticides in water and sediment by HPLC-HRMS and its relationship with the use and land occupation. **Quím. Nova**, vol.40, n.2, São Paulo, 2017.

CONCEIÇÃO, D. M. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibais, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.

DA CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; DE SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, 2015.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 411-414, 2003.

DA SILVA, L. C. N. **Degradação biológica de paraquat em reatores em bateladas por biomassa fúngica**. Dissertação (Mestrado). Departamento de Tecnologia em Gestão Ambiental, Fortaleza, Ceará, 89 p., 2015.

DOULATI, A.F.; BADII, KH.; YOUSEFI, L.N.; SHAFAEI, S.Z.; MIRHABIBI, A.R. Adsorption of direct red 80 dye from aqueous solution onto almond shells: effect of pH, initial concentration and shell type. **J. Hazard. Mater.** v. 151, p. 730-737, 2008.

EL-RAHIM, W. M. A.; EL-ARDY, O. A.; MOHAMMAD, F. H. A. The effect of pH on bioremediation potential for the removal of di-

rect violet textile dye by *Aspergillus niger*. **Desalination**, v. 249, p. 1206-1211, 2009.

ESPOSITO, E. E.; AZEVEDO, J. L. DE. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 510 p., 2004.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação – **Specifications and evaluations for agricultural pesticides: Paraquat dichloride**, 2003. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Paraquat08.pdf. Acesso em: 15 dez. 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GRIFFIN, D. H. *Fungal Physiology*, Wiley-Liss, New York, 1994.

HAI, F. I.; MODIN, O.; YAMAMOTO, K.; FUKUSHI, K.; NAKAJIMA, F.; NGHIEM, L. D. Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 459-462, 2012.

HARBHAJAN, S. **Mycoremediation: fungal bioremediation**. New Jersey, 2006.

IKEDA, Y.; PARK, E. Y.; OKUDA, N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technology**, v. 97, n. 8, p. 1030-1035, 2006.

KHAN, M. H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A., & ALAM, Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 4, p. 381-386, 2007.

KHELIFI, E.; AVED, L.; BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HAMDI, M. Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red descolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. **J. Hazardous Materials**, v.163, p. 1056-1062, 2009.

KODAMA, T.; DING, L.; YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 11, n. 4/6, p. 1073-1078, 2001.

KOPYTKO, M.; CHALELA, G.; ZAUSCHER, F. Biodegradation of two commercial herbicides by the bacteria *Pseudomonas putida*. **Electron. J. Biotech.**, v. 5, n. 2, 2002.

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

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. **Bioresour. Technology**, v. 87, n. 2, p.167-198, 2003.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Extração da fécula retida no resíduo fibroso do processo de produção de fécula de mandioca. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 20, p. 122-127, 2000.

MEKALA, N.K.; SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 151, p. 122-131, 2008.

MENEZES, G. D. G. **Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Engenharia Química, Rio de Janeiro, 68 p., 2006.

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.
- MIOLA JUNIOR, A.; SCHWANTES, D.; COELHO, G. F.; LEISMANN, E. A. V.; GONÇALVES JUNIOR, A. C. Remoção de clorpirifós de águas contaminadas por adsorventes de casca de mandioca modificados quimicamente. **I Encontro Anual de Iniciação Científica, Tecnológica e Inovação – EAICTI**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, 2015.
- OMOJASOLA, P. F.; JILANI, O. P. Cellulase production by *Trichoderma longi*, *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* cultured on waste materials from orange. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 20, p. 2382–2388, 2008.
- PENHA, E. das M, et al. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus Níger*. **Revista Ciência Rural**, v. 46, n.4, 2016.
- QUINGXIANG, Y.; LINGXIA, T.; MIN, Y.; HAO, Z. Effects of glucose on the decolorization of reactive black 5 by yeast isolates. **Journal of Environmental Science**, v. 20 p. 105–108, 2008.
- ROYER, B. **Remoção de corantes têxteis utilizando casca de semente de *Araucaria angustifolia* com biossorvente**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 68 p., 2008.
- SAMPAIO, G. M. M. S. **Remoção de metil paration e atrazina em reatores com fungos**. Tese de Doutorado em Engenharia Civil, área de concentração em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- SINGH, H. **Mycorremediation**. John Wiley e Sons, New Jersey, 2006.
- SOUZA, V. de. **Avaliação da contaminação do solo por metais tóxicos (cádmio, cromo, chumbo e alumínio) em estandes de tiro no estado do Paraná/Brasil**. Tese (Doutorado do Curso de Ambiente e Desenvolvimento). Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2017.
- STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J. T. V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267–2278, 2012.
- SUMATHI, S.; MANJU, B. S. Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 27, p. 347–355, 2000.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, 2002.
- TASTAN, B. E.; DONMEZ, G. Biodegradation of pesticide triclosan by *Aspergillus versicolor* in simulated wastewater and semi-synthetic media. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 33–37, 2015.
- WANG, J., PENG, S., WAN, Z., YUE, Z., WU, J., CHEN, T. Feasibility of anaerobic digested corn stover as biosorbent for heavy metal. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 453–456, 2013.