



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Adamares Marques da Silva

**Produção de Quitosana por *Absidia
corymbifera* em Meio de Baixo Custo e
Aplicação na Descoloração de Efluente
Industrial**

Recife
2010

Adamares Marques da Silva

Produção de Quitosana por *Absidia corymbifera* em Meio de Baixo Custo e Aplicação na Descoloração de Efluente Industrial

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientador: Profa. Dra. Clarissa Daisy Costa de Albuquerque

**Recife
2010**

S586p

Silva, Adamares Marques da

Produção de Quitosana por *Absidia corymbifera* em meio de baixo custo e aplicação na descoloração de efluente industrial / Adamares Marques da Silva ; orientador Galba Maria de Campos Takaki ; co-orientador Clarissa Daisy da Costa Albuquerque, 2010. 85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2010.

1. Resíduos industriais. 2. Quitosana. 3. *Absidia corymbifera*.
I. Título.

CDU 574.6

**Produção de Quitosana por *Absidia corymbifera* em Meio de
Baixo Custo e Aplicação na Descoloração de Efluente
Industrial**

Adamares Marques da Silva

Examinadores:

Prof^a. Dr^a Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP - PE

Prof Dr Elias Basile Tambourgi
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP- SP

Prof Dr Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco –UNICAP-PE

Defendida em: 21/12/2009

Coordenador:

Homenagem especial

Àqueles que sempre me ensinaram a ter fé e acreditar em meus ideais.
Minha querida mãe e meu querido pai, meus mais preciosos tesouros.

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki,
por ter me ajudado de forma significativa e fundamental,
ensinando-me lições importantes ao longo de todo tempo de convívio
e orientação do mestrado. Minha mais profunda admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu melhor amigo nos bons e maus momentos da minha vida.

Aos meus queridos pais, irmãs e irmão, por acreditarem na minha capacidade, por torcerem pelo meu sucesso e por me amarem sempre.

À Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki pela inigualável excelência no processo de orientação.

À Profa. Dra. Clarissa Daisy Costa de Albuquerque, pela co-orientação e pelas valiosas sugestões e contribuições que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Alexandra Salgueiro pelas sábias palavras de incentivo.

Ao Magnífico reitor da Universidade Católica de Pernambuco pela estrutura física de alta qualidade dos laboratórios dessa universidade.

Aos colegas da 4ª turma de mestrado, Cintya Rodrigues, Francisco Araújo, Luiz Queiroz, Roberto Lima, Ridelson Tavares, Rosileide Fontenele, Ormiro Joaquim, Selma Neide, pelo companheirismo, respeito e horas de descontração.

A todos demais professores que fazem parte do programa de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, por terem acreditado e contribuído para essa conquista.

Aos doutorandos, Alicia Jara, Aline Alves, Adriana Antunes, Clarissa Matos, Ednaldo Santos, Hélvia Casullo, em especial a Drª Marta Cristina Freitas e doutorandos Anabelle Camarotti e Antônio Cardoso pelo fundamental apoio durante os experimentos.

Aos funcionários Severino Humberto, Sônia Souza, André Felipe e Cláudio Roberto pelo apoio concedido durante os experimentos no Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – UNICAP.

Aos Professores Dr. Elias Tambourgi, Dr. Flávio Vasconcelos e Dr. Nelson Duran e ao técnico Francisco Camargo (Chico) pela acolhida durante os experimentos realizados na UNICAMP.

A UNICAMP pelo acesso aos laboratórios do Instituto de Química e Faculdade de Engenharia Química dessa instituição, através do projeto PROCAD – CAPES.

Por fim a todos àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para concretização dessa conquista que um dia foi chamada de sonho.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Classificação taxonômica dos Zygomycetes (RIBES et al., 2000, modificado HOLLMAN et al., 2008)	20
Figura 2	Estruturas reprodutivas de <i>Absidia corymbifera</i> (HOLLMAN et al., 2008)	21
Figura 3	Representação da estrutura química da quitina (ROSA 2008)	23
Figura 4	Representação da estrutura química da quitosana (ROSA 2008)	24

CAPÍTULO III

Figura 1	Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) uréia, (2) glicerina e (3) milhocina e como variável resposta o rendimento da biomassa	67
Figura 2	Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) uréia, (2) glicerina e (3) milhocina e como variável resposta o rendimento de quitosana produzida por <i>Absidia corymbifera</i>	68
Figura 3	Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) uréia, (2) glicerina e (3) milhocina e como variável resposta o pH final do meio de produção	69
Figura 4	Perfil de produção de biomassa por <i>Absidia corymbifera</i> em meio de cultivo contendo 6% Milhocina, 6% Glicerina e 0,25% Uréia, durante 96 horas de fermentação	70
Figura 5	Perfil de produção de quitosana por <i>Absidia corymbifera</i> em meio de cultivo contendo 6% Milhocina, 6% Glicerina e 0,25% Uréia, durante 96 horas de fermentação	71
Figura 6	Espectro na região do infravermelho de quitosana da melhor condição de produção (ponto central)	72
Figura 7	Espectro na região do infravermelho de quitosana comercial (padrão POLYMAR)	73
Figura 8	Difratograma de Raio- x da Quitosana produzida por <i>Absidia corymbifera</i> a partir da condição selecionada	74
Figura 9	Difratograma de Raio- x da amostra de Quitosana comercial (padrão POLYMAR)	75
Figura 10	Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^2 tendo como variáveis independentes (1) a concentração de quitosana isolada de <i>Absidia corymbifera</i> (2) agitação e como variável resposta a eficiência da descoloração do efluente industrial	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1	Characterization of raw effluent from soft drinker industry without treatment, and treated with chitosan powder and microsphere	40
Table 2	Color removal from of raw effluent from soft drinker industry without treatment, and treated with chitosan powder and microsphere	41

CAPÍTULO III

Tabela 1	Valores das variáveis independentes, níveis -1 e +1 e no ponto central	63
Tabela 2	Matriz do planejamento 2^3 decodificada e resultados da fermentação de <i>Absidia corymbifera</i> : glicose, produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH	63
Tabela 3	Níveis e valores das variáveis independentes do 1º planejamento fatorial 2^3	64
Tabela 4	Matriz codificada de planejamento fatorial completo 2^3 . Fatores: concentração da quitosana produzida por <i>Absidia corymbifera</i> e agitação. Variável resposta: remoção da cor do efluente (%)	64
Tabela 5	Demanda Química de Oxigênio e Sólidos Suspensos Totais do efluente industrial antes e após descoloração - Tempo de contato da Quitosana 30min	65
Tabela 6	Densidade óptica e pH do efluente industrial antes e após descoloração	65
Tabela 7	Eficiência da descoloração do efluente industrial através da quitosana isolada de <i>Absidia corymbifera</i>	66

LISTA DE ABREVIações

pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
COD	Chemical Oxygen Demand
SST	Sólidos Suspensos Totais
BDA	Batata Dextrose Ágar
GD	Grau de deacetilação
I _{CR}	Índice de Cristalinidade

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a capacidade sorbente da quitosana comercial em pó e biotecnologicamente processada em microesferas na descoloração de efluente industrial, sendo utilizados na concentração de 0,514g para cada 50mL do efluente. Os resultados obtidos demonstraram uma significativa redução da DQO (Demanda Química de Oxigênio) pela quitosana em microesferas (99%) do que em pó (96%), com 168 horas de contato. Resultados semelhantes foram obtidos no processo de descoloração do efluente industrial, tendo sido evidenciada uma remoção da cor do efluente de 98% e 96%, respectivamente, para microesferas e quitosana em pó, no mesmo período de contato. Os resultados obtidos com a quitosana em pó serviram de base para os estudos desenvolvidos com a produção microbiológica de quitosana por *Absidia corymbifera*, considerando o baixo custo daquele processo. Os experimentos foram realizados utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 , tendo como variáveis o resíduo industrial milhocina (obtido do beneficiamento do milho), glicerina (obtida do excedente da produção do biodiesel) e uréia, tendo como variáveis respostas a produção de biomassa e de quitosana. Os resultados obtidos indicaram uma produção máxima de biomassa de 21g/L e 88mg/g de quitosana. O polímero microbiológico foi caracterizado através do espectro de absorção ao raio infravermelho e difração de raios-X, indicando 90,3% de deacetilação e um índice de cristalinidade de 21%. A eficiência da quitosana em pó na adsorção foi avaliada utilizando um planejamento fatorial 2^2 , tendo como variáveis a concentração de quitosana e agitação, sob a variável resposta descoloração. Os resultados obtidos demonstraram um processo de remoção de 100,0% da cor do efluente de indústria produtora de refrigerantes e sucos, com uma redução de DQO de 99,8% e 90,0% de SST (Sólidos Suspensos Totais). Desta forma, os resultados confirmam a eficiência da quitosana microbiológica no processo biotecnológico de descoloração de efluente, sugerindo ser um método alternativo para minimizar a poluição das águas receptoras e reuso da água.

Palavras-chaves: Quitosana, *Absidia corymbifera*, efluente industrial, remoção da cor.

ABSTRACT

This work was evaluated the ability of commercial chitosan as sorbent powder and biotechnologically processed microspheres in the decoloration of industrial wastewater, being used at a concentration of 0.514 g per 50 ml of effluent. The results showed a significant reduction of COD (Chemical Oxygen Demand) by chitosan microspheres (99%) than powder (96%), during 168 hours of contact. Similar results were obtained during the decolorization of the industrial effluent; it was revealed a color removal of wastewater to 98% and 96%, respectively, for microspheres and chitosan powder in the same period of contact. The results obtained with chitosan powder were used for the studies with the microbial production of chitosan by *Absidia corymbifera*, considering the low cost of that process. The experiments were carried out using a 2³ full factorial design, with variables such as industrial waste corn steep liquor (obtained from milling of corn), glycerin (obtained from excess of production of biodiesel) and urea, with the variables response and biomass production of chitosan. The results indicated the maximum yield of biomass of 21g/L and 88mg/g of chitosan. The microbiological polymer was characterized by absorption spectra of the infrared ray and X-ray diffraction, indicating 90.3% of deacetylation and a crystallinity index of 21%. The efficiency of chitosan powder in adsorption was evaluated using a 2² factorial design, with variables like the concentration of chitosan and agitation in the response variable discoloration. The results showed a removal process of 100.0% of the color of the effluent from industry of soft drinks and juices, and a COD reduction of 99.8% and 90.0% of TSS (total suspended solids). Thus, the results confirmed the effectiveness of microbiological chitosan powder in the biotechnological process of decolorization of effluent, suggesting that an alternative method to minimize pollution of receiving waters and water reuse.

Key words: chitosan, *Absidia corymbifera*, industrial effluent, color removal.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1.1 Introdução	15
1.2 Objetivos	18
1.2.1 Objetivo Geral	18
1.2.2 Objetivos Específicos	18
1.3 Revisão da Literatura	19
1.3.1 Fungos	19
1.3.2 Zygomycetes	20
1.3.2.1 <i>Absidia corymbifera</i>	21
1.3.2.2 Aplicação Biotecnológica de <i>Absidia corymbifera</i>	22
1.3.3 Quitina	22
1.3.3.1 Quitosana	23
1.3.3.2 Aplicações Biotecnológicas da Quitosana	25
1.4.1 Tratamento de Efluentes	25
1.4.2 Adsorção	27
1.4 Referências Bibliográficas	28
CAPÍTULO II	29
Decolorization of effluent from soft drink industry by chitosan powder and microspheres	
Abstract	37
Introduction	38
Materials and methods	38
Results and discussion	39
Conclusions	39
References	41
CAPÍTULO III	43
Produção de Quitosana por <i>Absidia corymbifera</i> UCP 134 em Fermentação Submersa e Aplicação na Descoloração de Efluente Industrial	
Resumo	45
Introdução	46
Material e métodos	47
Resultados e discussão	52
Conclusões	58
Referências Bibliográficas	59
CAPÍTULO IV	
Conclusões Gerais	84

Capítulo I

1.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias para o tratamento adequado de efluentes proveniente de indústria de alimentos e bebidas, tem sido objeto de grande interesse nos últimos anos, devido ao aumento das exigências, e rigidez da legislação ambiental. Esses efluentes são ricos em matéria orgânica e inorgânica, mesmo em concentrações baixas, sendo capazes de gerar além da poluição visual, alterações nos ciclos biológicos dos recursos hídricos em que são lançados. É de vital importância a utilização de processos que permitam a remoção desses poluentes nesses diversos efluentes industriais descartados no meio ambiente (CHAVES et al., 2007; LEIFELD et al., 2009).

A qualidade ambiental tem como objetivo, a satisfação da sociedade como um todo, ultrapassando assim a concepção tradicional da qualidade do produto ou serviço, tendo em vista que ela tem como meta, o desenvolvimento sustentável, sem desperdícios. Assim, observa-se que resíduos são gerados em uma velocidade maior que a capacidade de reciclagem pelo meio ambiente, levando a Revolução Industrial do Século XIX, a introduzir novos padrões na geração de resíduos. Neste sentido, surgem quantidades excessivas e maiores em relação à capacidade da natureza, não sendo possível ocorrer os diversos processos de reciclagem de materiais (BRAGA et al., 2002).

Os efluentes gerados precisam ser coletado, tratados e ter um destino adequado. De forma geral, não existe um sistema de tratamento padrão para ser utilizado. Vários fatores podem influenciar na escolha das opções tecnológicas, tais como, disponibilidade de área, qualidade desejada para o efluente tratado, legislação referente ao local, entre outros. O tratamento biológico de efluentes é fundamentado em um processo que ocorre na natureza, o qual recebe globalmente a denominação de autodepuração ou estabilização. Basicamente o princípio do tratamento, está dirigido para a atividade de bactérias e outros microrganismos que oxidam a matéria orgânica. Investimentos para o desenvolvimento de novas tecnologias no tratamento de efluentes, tal como o processo de adsorção por biopolímeros, pode significar um grande salto para o desenvolvimento em termos da dotação da infra-estrutura requerida para proteger melhor o meio ambiente, e assim, dar condições de melhoria para a qualidade de vida da população. O lançamento de efluentes “*in natura*” nos recursos hídricos resulta além de vários problemas sócio-ambientais, em impactos significativos sobre a vida aquática e do meio ambiente como um todo (PIMENTA et al., 2002).

A maioria dos carboidratos na natureza ocorre sob a forma de polissacarídeos, e são polímeros de alta massa molecular. Os polissacarídeos, também denominados de glicanos, diferem entre si na identidade das unidades monossacarídicas encontradas em diversas cadeias carbônicas, tipos de ligação, no comprimento das cadeias e, ainda, no tamanho das ramificações (LEHNINGER 2002). A quitina é um homo polissacarídeo que apresenta o mesmo tipo de unidades monoméricas e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído na natureza, sendo um elemento estrutural encontrado especialmente nas carapaças de animais invertebrados e na constituição da parede celular de fungos (KENT, 1964; KAFETZOPOULOS, 1993; CAMPOS – TAKAKI, 2005).

A quitosana é conhecida e obtida pela deacetilação da quitina (poli- (1-4)-2-acetamida-2deoxi- β -D-glicano), podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de deacetilação, gerando assim, diversos derivados da quitosana. A molécula da quitosana (poli – beta – (1-4)-D-Glicosamina) tem um grupo amino e um grupo hidroxila, os quais podem ser modificados, alterando as propriedades físico-químicas. O processo da biotransformação da quitina em quitosana pode ocorrer por reações de deacetilação catalisadas pela enzima quitina deacetilase, sendo o processo inverso regulado metabolicamente, ou seja, a acetilação pela enzima quitinase, transformando a quitosana em quitina caracterizando, assim estes polissacarídeos como co-polímeros interdependentes (SANO et al., 1991; SHEPHERD et al., 1997; THARANATHAN, 2003; CAMPOS-TAKAKI, 2005). A quitosana é reconhecidamente uma biomolécula com grande aplicação biotecnológica em diversos setores industriais, destacando-se a área ambiental pelo fenômeno de adsorção de diversos contaminantes presentes em efluentes industriais. Além disso, apresenta eletrólitos catiônicos naturais que podem interagir com contaminantes orgânicos e inorgânicos de carga elétrica oposta, quando são utilizados em purificação de águas, atuando na redução significativa: da turbidez, cor, demandas química e biológica de oxigênio (AGULLÓ et al., 2004).

A ampliação dos estudos sobre a capacidade biossintética dos microrganismos, permitiu o desenvolvimento e expansão da biotecnologia na aplicação de processos e produtos. Neste sentido, vem sendo gerada perspectivas associadas aos produtos de alto valor agregado e de interesse industrial, despertando investigações que constituem novas bases da biotecnologia (ROBERT et al., 1991; CAMPOS – TAKAKI, 2005).

Os fungos constituem um grupo de organismos, cuja importância para a humanidade tem sido reconhecida durante vários séculos. São microrganismos importantes como agentes primários decompositores no ciclo do carbono, nitrogênio e de outros nutrientes da biosfera, e na deterioração de materiais. No entanto, a habilidade decompositora e

biodegradadora dos fungos não se limitam a atividades deletérias, mas inclui também a produção de muitos produtos importantes na indústria de alimentos, fármacos, entre outros. Entretanto, para controlar as atividades dos fungos, torna-se necessário conhecer o metabolismo fisiológico e bioquímico, para expressar o potencial biotecnológico (GRIFFIN, 1994; PELCZAR et al., 1996; CAMPOS-TAKAKI, 2005).

Entre os Zygomycetes, a ordem Mucorales apresenta um maior número de representantes (299 espécies), sendo também conhecidos como fungos do açúcar, pela habilidade enzimática de catabolizar glicose e sacarose (HAWKSWORTH et al., 1995).

No presente estudo, foi investigada a linhagem de *Absidia corymbifera* (Mucorales) no crescimento e na produção de quitosana, a partir do uso da glicerina excedente da produção do biodiesel, como fonte de carbono, como também milhocina, (resíduo do beneficiamento do milho), empregando um planejamento de 2^3 completo, com a finalidade de aplicar no processo de descoloração de efluente industrial de refrigerantes e sucos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a produção de quitosana microbiológica por *Absidia corymbifera* em meio de baixo custo (glicerina e milhocina) e comparar com o potencial da quitosana de crustáceos, aplicação na descoloração de efluente industrial.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o perfil de crescimento de *A. corymbifera* associado à produção de quitosana em meio de baixo custo;
- Avaliar os efeitos e interações das concentrações de glicerina, milhocina e uréia na produção de biomassa e de quitosana;
- Caracterizar através de métodos físico-químicos a quitosana microbiológica;
- Comparar a capacidade sorbente da quitosana microbiológica com a de crustáceo no processo de descoloração de efluente industrial;
- Avaliar os efeitos e interações da concentração de quitosana, do tempo de contato e da agitação sobre a remoção de cor de efluente industrial;
- Caracterizar através de métodos físico-químicos o efluente industrial antes e após processo de descoloração;
- Validar os processos de produção de biomassa e de quitosana, como também da ação sorbente na descoloração de efluente industrial.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Fungos

A estrutura celular dos fungos é semelhante a dos outros eucariotos, sendo constituída por uma membrana, citoplasma com as organelas distribuídas aleatoriamente por todo interior celular e um compartimento especial, o núcleo, que armazena o material genético. As células podem ser encontradas na forma unicelular, como as leveduras, ou então forma filamentosa denominada hifas, septadas ou não, que forma o micélio, como no caso dos fungos filamentosos. Os fungos possuem parede celular, quimicamente diferente da parede encontrada em vegetais, ainda que exerçam os mesmos tipos de funções (MADIGAN et al., 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005; FUKUDA et., 2009).

A parede celular fúngica pode ser caracterizada como uma estrutura relativamente rígida, porém dinâmica, que participa de vários processos biológicos essenciais à célula. Ela determina o formato da célula, fornece suporte osmótico, proteção física, além de estar relacionada a processos de sinalização celular, adesão e reprodução (PEREZ et al., 2004; MAGNELLI et al., 2005; NIMRICHTER et al., 2005), sendo por isso necessária para o crescimento e desenvolvimento dos fungos nos diversos ambientes onde são encontrados (DURAN et al., 2004). O crescimento micelial é dependente do processo de translocação, onde o material celular é direcionado para as regiões em desenvolvimento da célula (BOSWELL et al., 2003), permitindo a formação das estruturas celulares, como a parede, e com isso facilitando a ocupação dos ambientes pelos microrganismos. A parede celular compreende cerca de 20-30% do peso seco da célula fúngica (SMITH et al., 1999); sua composição química, estrutura e dimensão variam consideravelmente, dependendo do gênero, da espécie e das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial e essa formação é coordenada com o ciclo celular (KLIS et al., 2006).

A composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são compostos mais freqüentes na parede celular, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies de fungos (ADAMS, 2004; FERRACINI-SANTOS and SATO, 2009).

Os fungos são, em grande maioria, aeróbios obrigatórios ou facultativos. São quimiotróficos e secretam enzimas que degradam uma ampla variedade de substratos

orgânicos em nutrientes solúveis, que são então absorvidos passivamente ou capturados na célula por transporte ativo (JAWETS et al., 2000).

1.3.2 Zygomycetes

A maioria dos membros deste grupo de fungos são sapróbios por excelência em matéria orgânica em decomposição, e em fezes de herbívoros, sendo conhecidas espécies coprófilas obrigatórias e facultativas. Alguns poucos gêneros são reconhecidos como apresentando espécies parasitas de plantas superiores, outros podem atacar grãos, legumes e frutos estocados (ALEXOPOULOS et al., 1996; TRUFFEM, 2000). Os Zygomycetes são representados por seis ordens, dentre elas encontra-se a Mucorales (Figura 1) sendo também conhecidos como fungos do açúcar, uma vez que sua capacidade de degradação limita-se às moléculas de estruturas mais simples, como a glicose e sacarose. Os representantes dessa ordem são os primeiros fungos a colonizar um substrato, crescendo rapidamente, com micélio denso e conspícuo, chegando a atingir 2 – 3 cm de altura (HESSELTINE e ELLIS, 1973).

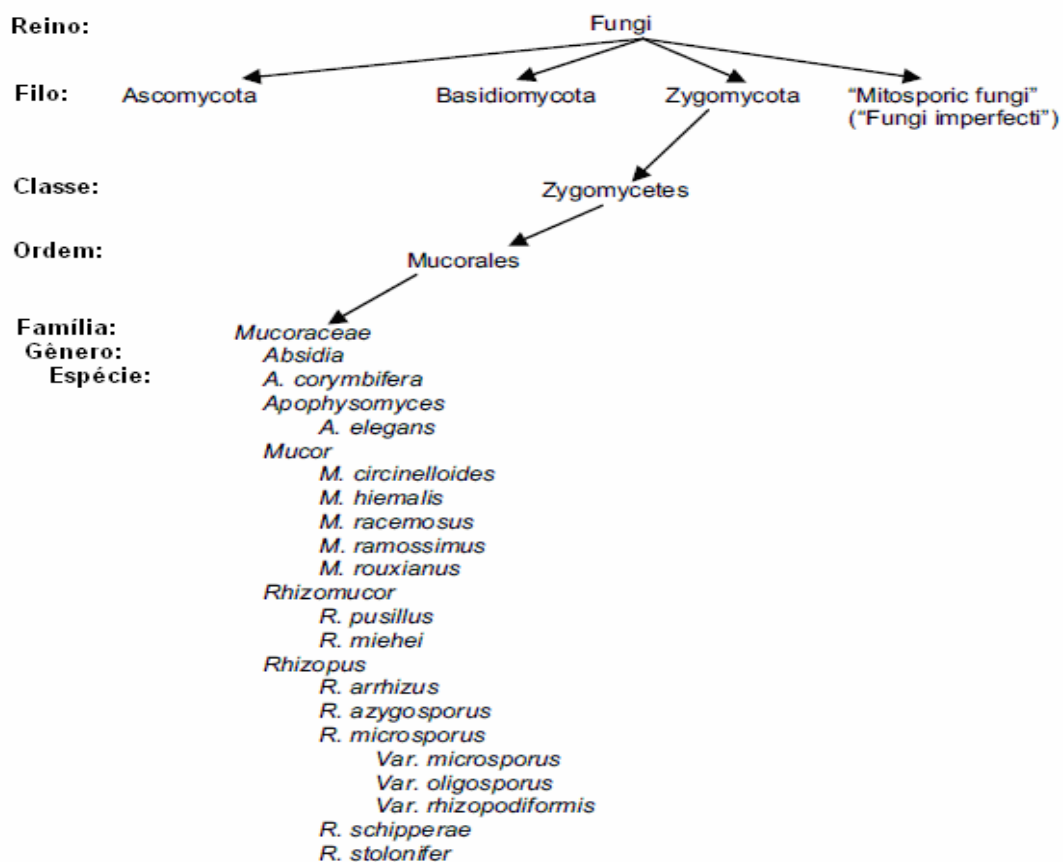


Figura 1 – Classificação taxonômica dos Zygomycetes (RIBES et al., 2000, modificado HOLLMAN et al., 2008).

1.3.2.1 *Absidia corymbifera*

Absidia sp. é um fungo filamentososo encontrado no solo em vegetações apodrecidas. Pertencem à classe Zygomycetes e estão distribuídos em todo o mundo e comumente encontrados em plantas e detritos do solo, podendo também ser isolados a partir de alimentos e do ar (KITABAYASHI et al., 1998). A *A. corymbifera* possui esporangiósporo, estruturas assexuada, que se originam no interior de cavidades especializadas chamadas esporângios. Uma vesícula, esporangióforo, proveniente da hifa, forma esporos no seu interior; ocorrendo rompimento da vesícula onde são liberados os esporangiosporos (Figura 2).

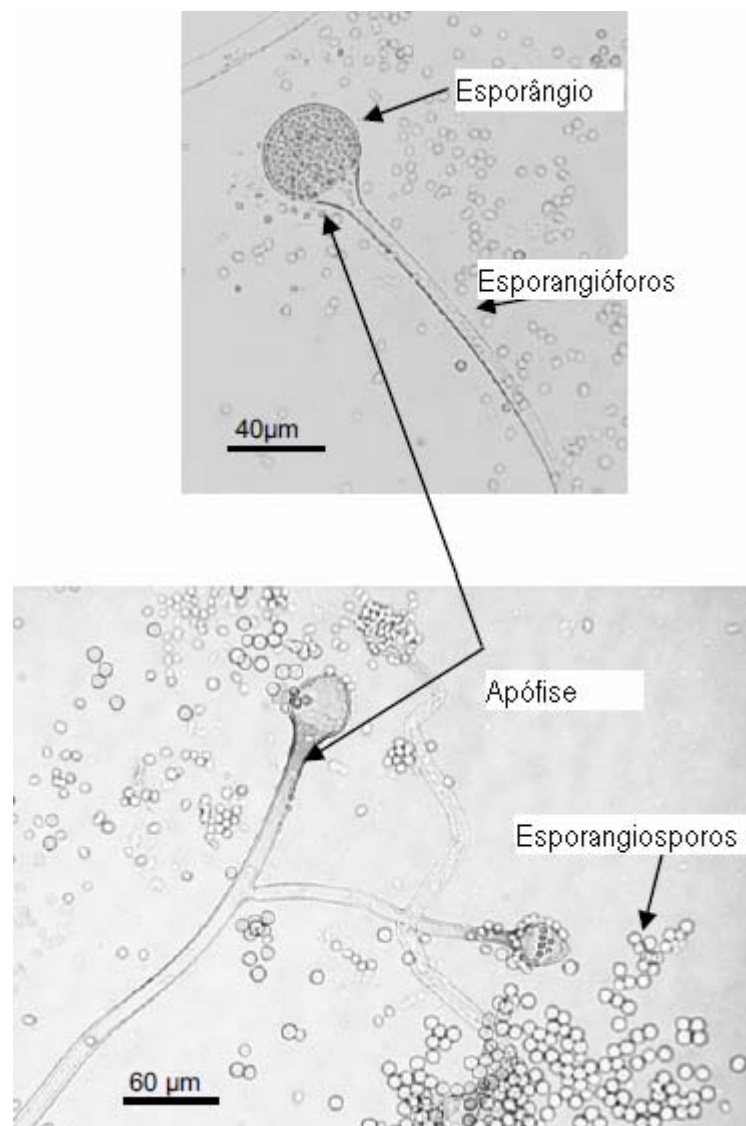


Figura 2 – Estruturas reprodutivas de *Absidia corymbifera* (HOLLMAN et al., 2008)

A principal característica do *Absidia* é um crescimento rápido. Os esporangióforos são geralmente eretos, simples ou pouco ramificados, muitas vezes ramificados e septados, normalmente ao longo dos estolões, mas não o contrário. Fisiologicamente, o gênero *Absidia* engloba espécies de mesófilos e termotolerantes, entre as quais estão àquelas espécies que possuem a capacidade de crescimento entre 20 - 42 ° C. Algumas espécies mesófilas são consideradas importantes biotecnologicamente na biotransformação de esteróides (VON ARX, 1983; BENNY et al., 2001).

1.3.2.2 Aplicação Biotecnológica de *Absidia corymbifera*

A capacidade das espécies e cepas fúngicas isoladas para eliminar alguns herbicidas e fungicidas encontrados em concentrações elevadas no solo, tem sido pesquisada. E determinou-se que fungos presentes no solo se adaptam a essas situações críticas ecológicas, dentre eles *A. corymbifera*, que são úteis no domínio da poluição química, quer como bioindicadores ou como agentes de desintoxicação e biorremediação (BORDJIBA et al., 2001). Até o presente momento não foram encontrados relatos, na literatura consultada, sobre a utilização de *Absidia corymbifera* para obtenção de quitosana.

1.3.3 Quitina

Um dos constituintes da parede celular de fungos é a quitina, um homopolímero linear, longo, formado por resíduos de N-acetilglucosamina β -(1→4) ligados. Compreende cerca de 1 a 2% da parede celular de leveduras embora seja encontrada em maior proporção (10 a 20%) em fungos filamentosos. Pontes de hidrogênio dão origem a microfibrilas de quitina. Essas estruturas suportam grandes pressões e, portanto, tornam-se responsáveis pela integridade da parede celular. Quando a síntese da quitina é interrompida, a parede celular torna-se desorganizada e a célula fúngica sofre deformações e instabilidade osmótica (BOWMANN e FREE, 2006).

O grande interesse dos estudos voltados para o emprego da quitina e seus derivados é devido às suas propriedades de polieletrólitos, a presença de grupos funcionais reativos, alta capacidade de adsorção, biodegradabilidade, atividade antitumoral, atividade bacteriostática e antifúngica desses biopolímeros (SINOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003).

Modificações químicas na molécula de quitina (figura 3) geralmente são dificultadas devido a esse polissacarídeo possuir uma estrutura altamente cristalina, com fortes interações entre hidrogênios intra e intermoleculares (SCHIGEMASA et al., 1999). Um

derivado possível que pode ser obtido a partir da deacetilação da quitina é um polímero hidrolisado muito estudado e conhecido, a quitosana (figura 5) (THANOO et al., 1991; LEE et al., 1996).

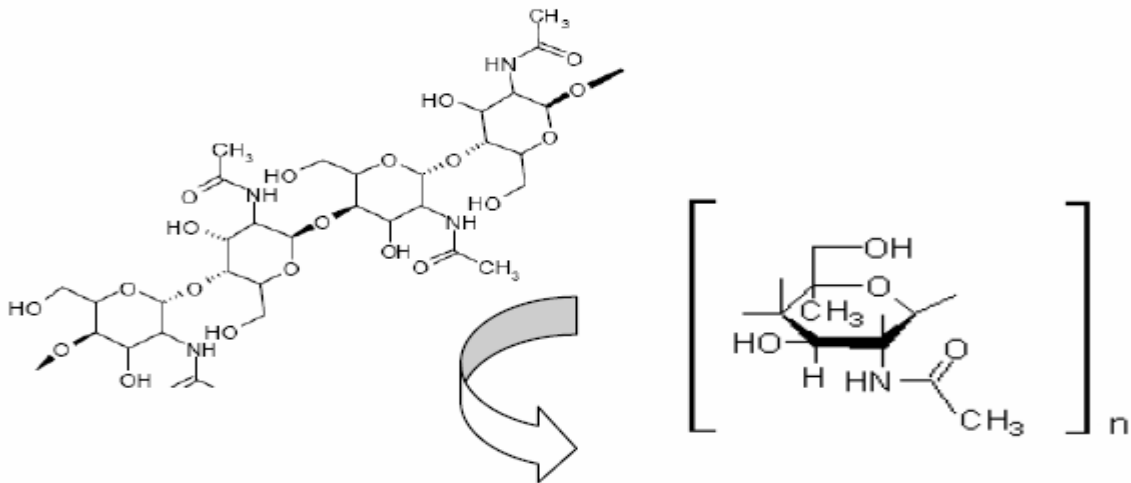


Figura 3 – Representação da estrutura química da quitina (ROSA 2008).

1.3.3.1 Quitosana

A quitosana é um componente natural presentes nas paredes celulares de fungos pertencentes à Zygomycetes podendo ser produzida pela extração, álcali-ácido solúvel, das paredes celulares do fungo (WHITE et al., 1979; TAN et al., 1996; AMORIN et al., 2006). Este método ainda não é utilizado em escala industrial, embora possa oferecer uma alternativa à desacetilação química, independente da produção da quitina de crustáceos. Além disso, a quitosana fúngica possui uma maior bioatividade do que a quitosana de outras fontes de quitina, tornando-se especialmente importante em aplicações médicas (JAWORSKA et al., 2001). A formação da quitosana em paredes celulares de fungos é um resultado da ação complexa de duas enzimas: quitina deacetilase e quitina sintase. (DAVIS e BARTNICKI-GARCIA, 1984; BARTUNICKI-GARCIA, 1989).

O rendimento de quitosana a partir de biomassa de fungos depende de vários fatores, incluindo: a espécie do fungo, o método de cultivo, e os parâmetros de cultivo (pH, temperatura, tempo de cultivo). Um bom rendimento da quitosana pode ser obtido mediante ao aumento da produção de biomassa ou do conteúdo de quitosana de parede fúngica (JAWORSKA et al., 2001).

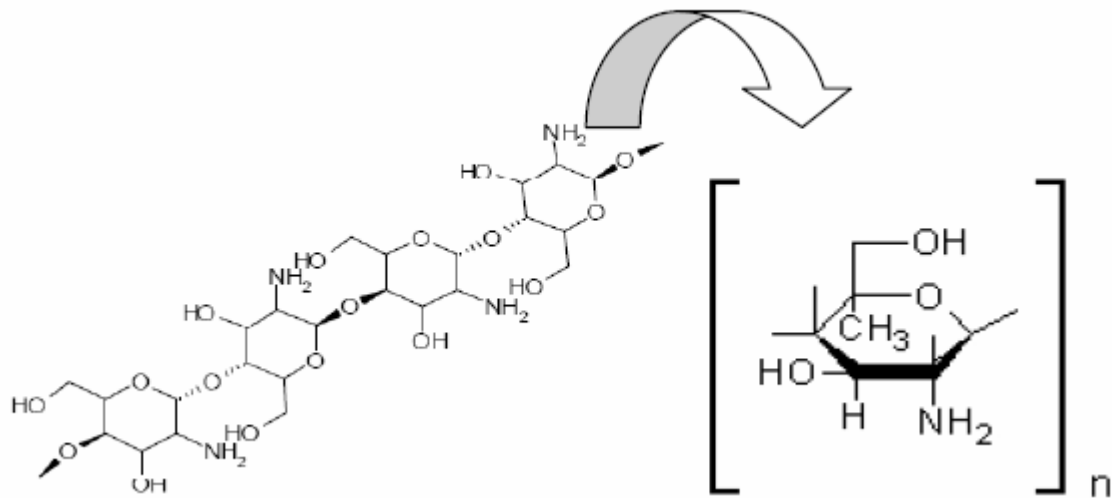


Figura 4 – Representação da estrutura química da quitosana (ROSA 2008).

Um das principais características desse polímero é a insolubilidade em água e determinados solventes orgânicos (ROSA, 2008). Possui também grupos amínicos livres, é solúvel em soluções ácidas, em pH inferior a 6,5, e insolúvel em pH superior a 6,5, ácido sulfúrico, solventes orgânicos e grupos amínicos protonados (-NH^{3+}), apresenta baixa solubilidade em ácido fosfórico e possui capacidade de formar soluções viscosas com formação de geleificação com poliânions e de se solubilizar em misturas de água e álcool (MUZARELLI et al., 1986).

A quitosana apresenta, em maior proporção, na cadeia polimérica unidades de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose, e um menor número de unidades β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glicose da quitina (figura 4). Possui semelhança com a celulose na sua estrutura química, mas exibe propriedades bastante diferentes, sendo quimicamente mais versátil devido à presença do grupo amino (BADE, 1997; LARANJEIRA and FAVERE, 2009).

Os principais parâmetros que comumente são determinados e que representam as propriedades de polímeros, inclusive a quitosana, são o grau de deacetilação, massa molar viscosimétrica, polidispersão e cristalinidade. Para aplicações relacionadas ao consumo humano, como alimentos e aplicações médicas, o grau de pureza (teor de cinzas), a umidade e o conteúdo de metais pesados, endotoxinas e proteínas devem ser determinadas (ARANAZ et al., 2009). Estudos relatam que o grau de deacetilação é considerado uma das

mais importantes características químicas, e que pode influenciar no desempenho da quitosana em adsorção (LI et al., 1992; BAXTER et al., 1992; FERREIRA et al., 2000).

1.3.3.2 Aplicações Biotecnológicas da Quitosana

O grande potencial biotecnológico da quitosana é devido a possibilidade de se obtê-la purificada em larga escala, junto a sua habilidade de ser usada em diversas formas, como pós, soluções, géis, filmes, fibras, pérolas e membranas, a quitosana tem sido utilizada em muitas aplicações comerciais (SANDFORD, 1988). Nessa última década, a quitosana tem sido o biopolímero reconhecido como um promissor biomaterial para aplicações biomédicas. A esse respeito, tem sido mostrada sua aplicabilidade como material de revestimentos de ferimentos, dispositivos homeostáticos, sistema de carreamento e liberação de genes/DNA e engenharia de tecidos. As propriedades físico-químicas da quitosana exploradas para propósitos biológicos são hidrofiliabilidade, carga elétrica positiva, capacidade de reticular e dessolvatar. Além disso, devem-se ressaltar suas conhecidas propriedades biotecnológicas tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, capacidade de se aderir a superfícies mucosas e a possibilidade de se ligar a proteínas, enzimas, genes, ácidos nucleicos e lipídeos ácidos (VASCONCELOS, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2009).

Estudos envolvendo o uso de bioadsorventes em águas residuárias vêm sendo realizados para remoção de contaminantes em efluentes, dentre eles encontra-se biopolímeros com grupos positivamente carregados, como a quitosana, que vem ganhando espaço neste campo da pesquisa (CHATTERJEE et al., 2006).

Quitosana têm sido utilizada para remover uma grande variedade de poluentes das águas e efluentes, onde tem sido extensivamente estudada em relação ao efeito da adsorção, sobre os metais, corantes e compostos orgânicos entre outros, (NO e MEYERS, 2000; GUIBAL et al, 2006; CAMPANA-FILHO et al., 2009). O uso de materiais à base de quitosana para remover corantes aniônicos foi revisto por CRINI e BADOT no ano de 2006, onde menciona especificamente o efeito das características de quitosana sobre o processo de adsorção.

1.4.1 Tratamento de Efluentes

Grandes volumes de efluentes são gerados por diversos processos industriais, os quais muitas vezes não recebem tratamento adequado, chegando a serem lançados em corpos hídricos como rios e riachos, agredindo o meio-ambiente e gerando desperdício de

água. Devido a esse fato, várias ações vêm sendo realizadas no sentido de tratar esses efluentes para que ocorra a diminuição de contaminantes presentes a concentrações aceitáveis (GOGATE et al., 2004).

Um dos fatores importantes para a diminuição da geração de efluentes no processo fabril, é a reutilização e racionalização das águas utilizadas no processo produtivo. Visto que cada vez mais que se reutiliza e/ou racionaliza, uma quantidade menor de resíduos é gerada para ser tratado, contribuindo para uma produção limpa, com menores gastos de reagentes, energia e utilização de microrganismos em uma estação de tratamento de efluentes.

A redução da poluição dos processos industriais pode ser feita basicamente de duas formas: a primeira, com uso de “tecnologias limpas”, ou seja, prevenindo a poluição em cada etapa do processo; a segunda, com o tratamento no “final-do-cano”, isto é, tratando o efluente produzido. A segunda opção continua sendo a mais adotada principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. Mesmo assim, isto é uma evolução, mediante a deplorável situação de até pouco tempo atrás onde grandes volumes dos mais diversos tipos de efluentes eram lançados no meio-ambiente sem tratamento algum. As maiores evidências de restrições regulatórias no que concerne aos efluentes estão mudando essa situação aos poucos (ALI et al., 2001). Com isso diversos tipos de tratamentos são usados para remoção de contaminantes (WESENBERG et al., 2003; CRINI et. al., 2005). Bilotta e Brazier (2008), relataram que sólidos em suspensão podem causar grave degradação ecológica dos ecossistemas aquáticos e inaceitável deterioração da qualidade da água levando a sérios problemas ambientais. A maioria dos poluentes podem ser significativamente reduzidas pelos métodos físicos, químicos e biológicos, tais como coagulação/floculação, oxidação química ou eletroquímica, processos biológicos de adsorção e separação de membrana (CRINI, 2007).

O tratamento de efluentes pode ser didaticamente dividido em métodos biológicos e físico-químicos. Os métodos biológicos podem ser dos tipos aeróbios ou anaeróbios. Dentre os aeróbios, o de lodo ativado é o comumente utilizado para o tratamento de esgotos domésticos (HEBERER, 2002). Reatores com filtros anaeróbios em uma fase única foram utilizados no tratamento de efluentes de laticínios, principalmente aqueles com baixas concentrações de sólidos suspensos, obtendo-se taxas de remoção de DQO de 78% a 92% em escala laboratorial. No entanto, quando a concentração de sólidos suspensos é elevada, a eficiência do processo é comprometida. Pelo fato de serem pouco eficientes na remoção

de DQO solúvel, os processos físico-químicos costumam ser associados aos biológicos, os quais conseguem remover a maior parte da matéria orgânica (DEMIREL et. al., 2005).

1.4.2 Adsorção

A reciclagem dos efluentes industriais depende ainda da remoção de cor, sólidos e desinfecção, a qual vem sendo efetuada de forma promissora por técnica de adsorção por biopolímeros (FARIA et al., 2004). A adsorção, além da eficiência, pode ser preferida por questões de custo, como é o caso do controle da poluição de efluentes industriais (HEBERER, 2002).

Os processos de coagulação, floculação e adsorção em águas residuárias utilizando quitosana, dependem do grau de deacetilação para que torne-se eficiente na remoção de íons metálicos, e corantes aniônicos (NO e MEYERS, 2000; GUIBAL, 2004). A quitosana também tem sido usada como adsorvente, coagulante e bactericida no tratamento de efluentes de aquicultura. Enquanto o maior o grau de deacetilação, maior a remoção de compostos orgânicos, nutrientes inorgânicos (nitratos, fosfatos) e patógenos (CHUNG, 2008). Além disso, amostras de quitosana com baixa cristalinidade e alto grau de deacetilação, são geralmente preferidos para o processo de adsorção (ARANAZ et al., 2009).

Entre os biopolímeros, a quitosana, obtida da desacetilação alcalina da quitina extraída a partir de fontes de crustáceos, parede celular fúngica e exoesqueleto de insetos, pode ser considerado como um dos mais promissores adsorventes para fins ambientais e purificação, e no tratamento de águas brutas e residuárias (KURITA, 2006; RENAULT et al. 2009). A quitosana possui alta densidade de carga catiônica, longas cadeias de polímeros, ponte de agregados e precipitação. Como é uma biomacromolécula, tem a vantagem de ser biodegradável, não tóxica, não corrosiva, e segura de manusear. Não é um poluente comparado com floculantes químicos convencionais, evitando contaminações secundárias. Além disso, esse biopolímero apresenta alta capacidade de adsorção, comportamento que o torna muito eficiente nas interações com as partículas e substâncias dissolvidas. Assim, ele pode potencialmente ser aplicado em água e tratamento de residuais como um promissor bioadsorvente (KURITA, 2006).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. Fungal Cell Wall Chitinases and Glucanases. **Microbiology**, West Berkshire, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.
- AGULLÓ, E.; MATO, R.; PENICHE, C.; TAPIA, C.; HERAS, A.; ROMAN, J. S.; ARGÜELLES, W.; GOYCOOLEA, F.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A. P. **Quitina e Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones**. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima: 2004. p. 209-255.
- ALBUQUERQUE, R. B.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, T. C.M. Perspectiva e Potencial Aplicação de Quitosana como Inibidor de *Listeria Monocytogenes* em Produtos Cárneos. **Revista iberoamericana de polímeros**, Bilbao, v. 10, n. 5, p. 260-274, 2009.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: Wiley and Sons, Inc. 1996. p. 896.
- ALI, M.; SREEKRISHNAN, T. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. **Advances In Environmental Researches**, New York, v. 5, n. 2, p. 175-196, 2001.
- AMORIM, R.V.S.; SOUZA, W.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI GM Faster Chitosan Production from Mucorales Strains in Submerged Culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 20–23, 2001.
- AMORIM, R.V.S.; MELO, E.S.; CUNHA, C. M.G.; LEDINGHAM, W.M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* Used as a Film Support for Lipase Immobilization. **Bioresource Technology**, New York, v. 89, p. 35–39, 2003.
- BAXTER, A.; DILLON, M.; ANTHONY, T. K. D.; ROBERTS G.A.F. Improved Method for I. R. Determination of the Degree of N-acetylation of Chitosan. **Journal of Biology Macromolecules**, New York, v. 14, n. 3, p. 66-69, 1992.
- BADE, M. L. Structure and isolation of native animal chitins. In: **Biopolymers Utilizing Nature's Advanced Materials**. Symposium at the Fifth Chemical Congress of North America, Cancun: American Chemical Society, 1997.
- BARTNICKI-GARCIA, S. The Biochemical Cytology of Chitin and Chitosan Synthesis in Fungi. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANFORD, P.A. (Ed.). **Chitin and chitosan**. New York: Elsevier, 1989, p. 23–35.
- BENNY, G. L.; HUMBER, R. A; MORTON, J. B. *Zygomycota: Zygomycetes*. In: MCLAUGHLIN, D. J.; MCLAUGHLIN, E. G.; LEMKE, P. A. (Ed.), **The Mycota Part A: Systematics and Evolution**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. v. 7, p. 113–146.

BIOLOTA, G. S.; BRAZIER, R. E. Understanding the Influence of Suspended Solids on Water Quality and Aquatic Biota. **Water Resource**, New York, v. 42, n. 12, p.2849–2861, 2008.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. G. L.; BARROS, M. T. L.; VERAS JR, M. S.; NUCCI, N. L. R.; JULIANO, N. M. A.; EIGER, S. **Introdução à engenharia ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, 2002.

BORDJIBA, O.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUD, P. Removal of Herbicides from Liquid Media by Fungi Isolated from a Contaminated Soil. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 30. p. 418-426, 2001.

BOSWELL, G. P.; JACOBS, H.; DAVIDSON, F. A.; GADD, G. M.; RITZ, K. Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments. **Bulletin of Mathematical Biology**, New York, v. 65, n. 3, p. 447-477, 2003.

BOWMAN, N. S. M.; FREE, S. J. The Structure and Synthesis of the Fungal Cell Wall. **BioEssays**, Wilmington, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.

CAMPANA-FILHO, S. P; BRITTO, D. Estudo das Interações Entre o Complexo Polieletrólítico Trimetilquitosana/Carboximetilcelulose e Cu⁺², Ácido Húmico e Atrazina em Solução Aquosa. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 461-466, 2009.

CAMPOS TAKAKI, G.M. The Versatility on Copolymers Chitin and Chitosan Production. In: DUTTA, P. K. **Chitin and Chitosan Opportunities & Challenges**. Midnapole: New Age International, 2005. p. 1-18.

CHAVES, K. O.; GOMES, R. B.; ARAÚJO, R. S.; BUARQUE, H. L. B. Cinética da Adsorção de Corante Índigo Carmim em Biomassa Fúngica Morta de *Aspergillus niger* Tratado Alternadamente com Soluções Ácidas e Alcalinas. In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 11, Benfica, 2007. **Anais...**: Centro Federal de Educação Tecnológica do Estado do Ceará, 2007. *Disponível em:* <http://www.redenet.edu.br/publicacoes/arquivos/20080213_082617_MEIO-051.pdf> Acesso em: 20 nov. 2009.

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEEA, B. P.; DAS, A.I R.; GUHA, A.K. Adsorption of a Model Anionic Dye, Eosin Y, from Aqueous Solution by Chitosan Hydrobeads. **Journal of Colloid Interface Science**, New York, v. 288, n. 1, p. 30-35, 2005.

CHUNG, Y. C. Improvement of Aquaculture Wastewater Using Chitosan of Different Degrees of Deacetylation. **Environmental Technology**, London, v. 27, n.11, p.199-208, 2006.

COGATE, P. R.; PANDIT, A. B. A Review of Imperative Technologies for Waste Treatment: Oxidation Technologies at Ambient Condition. **Advances on Environmental Resource**, Amsterdam: Elsevier, v. 8, n. 3-4, p. 501-551, 2004.

CRINI, G. Recent Developments in Polysaccharide-Based Materials Used as Adsorbents in Wastewater Treatment. **Progressive Polymers Science**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 38-70, 2005.

CRINI, G.; BADOT, P. M. **Traitement et Épuration des Eaux Industrielles Polluées**, França: Press Universitaires de Franche-comté, 2007.

CRINI, G.; BADOT, P. M. Application of Chitosan, a Natural Aminopolysaccharide, for Dye Removal from Aqueous Solutions by Adsorption Processes Using Batch Studies: A Review of Recent Literature. **Progressive Polymers Science**, Amsterdam, v. 33, p.399-447, 2008.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e Caracterização de Membranas de Quitosana para Aplicação na Regeneração de Pele**. 2005. 180 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. UNICAMP. São Paulo, 2005.

DAVIS, L. L.; BARTNICKI-GARCIA, S. Chitosan Synthesis by the Tandem Action of Chitin Synthetase and Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 23, p. 1065–1073, 1984.

DEMIREL, B.; YENIGUN, O.; ONAY, T. T. Anaerobic Treatment of Dairy Wastewaters: A Review. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, n. 8, p. 2583-2595, 2005.

DIAS, F. S.; QUEIROZ, D.C.; NASCIMENTO, R. F.; LIMA, M. B. Um Sistema Simples para Preparação de Microesferas de Quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p.160-161, 2008.

DURAN, A.; NOMBELA, C. Fungal Cell Wall Biogenesis: Building a Dynamic Interface with the Environment. **Microbiology**, Grã-Betanha, v. 150, n. 10, p. 3099–3103, 2004.

FARIA, P. P.; ÓRGÃO, J. J. M.; PEREIRA, M. F. R. Adsorption of Anionic and Cationic Dyes on Activated Carbons with Different Surfaces Chemistries. **Water Resource**, New York, v. 38, p. 2043, 2004.

FERRACINI-SANTOS, L.; SATO, H. H. Isolamento de Polímeros da Parede Celular de *Saccharomyces cerevisiae* e Avaliação da Atividade Antioxidante da Manana-Proteína Isolada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2. p. 322-326, 2009.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e Oportunidades na Química da Sacarose e Outros Açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A.F.D.;MATIAS, A.C.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R. F.H.; SILVA, M.L.C. Polissacarídeos de Parede Celular Fúngica: Purificação e Caracterização. **Semina**, Londrina, v. 30, n. 1. p. 117-134, 2009.

GUIBAL, E. Interactions of Metal Ions with Chitosan-Based Sorbents: A Review. **Separation Purificated Technology**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 43-74, 2004.

GUIBAL, E.; VAN V. M.; DEMPSEY, B. A.; ROUSSY, J. A Review of the Use of Chitosan for the Removal of Particulate and Dissolved Contaminants. **Separation Science Technology**, London, v. 41, n. 11, p. 2487-514, 2006.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2. ed. New York: Wilwy-Liss, 1994.

HAWKSWORTH, D. L.; KIRK, P. M.; SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. 8. ed. Wallinford: CAB International, 1995.

HEBERER, T. Occurrence, Fate, and Removal of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment: A Review of Recent Research Data. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 131, p. 5-17, 2002.

HELSELTINE, C. W.; ELLIS, J. J. Mucorales. In **The Fungi: an advanced treatise**. AINSWORTH. SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A. S. (Eds.). New York: Academic Press, 1973. v. 4B, p. 187-217.

HOLLMANN, M.; RAZZAZI, F. E.; GRAJEWSKI, J.; TWARUZEK, M.; SULYOK, M. Detection of 3-nitropropionic Acid and Cytotoxicity in *Mucor circinelloides*. **Mycotoxin Research**, Berlin, v. 24, n. 3. p. 140-150, 2008.

JAWORSKA, M. M.; KONIECZNA, E. The Influence of Supplemental Components in Nutrient Medium on Chitosan Formation by the Fungus *Absidia orchidis*. **Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 56, p. 220–224, 2001.

JAWETZ, E; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LARANJEIRA, M. C. M.; FAVERE, V. T. Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEE, K. Y.; PARK, W. H.; HA, W. S. Polyelectrolyte Complexes of Sodium Alginate with Chitosan or its Derivatives for Microcapsules. **Journal of Applied Polymers Science**, New York, v. 63, p. 425-432, 1996.

LEHNINGER, A. L. **Biochemistry**. 2. ed. Nova York: W. H. Freeman, 2002.

LEIFELD, V.; RIVAS, L. M. C. G.; BARANA, A. C. Comparação Entre Filtros Biológicos Anaeróbios para o Tratamento de Efluente de Abatedouro com Diferentes Sistemas de Alimentação. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, Ponta Grossa, v. 1, n. 1, p. 96 -102, 2009.

LI, Q.D.; DUNN, E.T.; GRANDMAISON, E.W.; GOOSEN, M.F.A. Applications and Properties of Chitosan. **Journal of Bioactive Compatible Polymer**, London, v. 7, p. 370, 1992.

- KAFTZOPOULOS, D. Bioconversion of Chitin to Chitosan: Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Mucor rouxii*. **Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America**, Washington, v. 90, n.7, p. 2564-2568, 1993.
- KENT, P. W.; FLORKIN, M.; MANSON, H.S. Chitin and Mucosubstances. In: **Comparative Biochemistry**. FLORKIN, M.; MASON, H. S. (Eds.). New York, 1964, v. 7, p. 93–136.
- KIMURA, I.Y.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M.; JOSUÉ, A.; NASCIMENTO, A. Avaliação da Capacidade de Adsorção do Corante Reativo Laranja 16 pela Quitosana. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 22, n. 5, p. 1161-1162, 2000.
- KIMURA, I.Y.; GONÇALVES JR, A. C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M C. M.; FÁVERE, V.T. Efeito do pH e do Tempo de Contato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesferas de Quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 9, n. 3, p. 52-54, 1999.
- KITABAYASHI, A.; HIROKAWA, M.; YAMAGUCHI, A.; TAKATSU, H.; MIURA, A. B. Invasive Pulmonary Mucormycosis with Rupture of the Thoracic Aorta. **American Journal of Hematology**, New York., v. 58, n. 4, p. 326-9, 1998.
- KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell Wall Construction in *Saccharomyces cerevisiae*, **Yeast**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 185–202, 2006.
- KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Marine Biotechnology**, New York, v. 8, p. 203–206, 2006.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. Glucanase-Driven Fractionation Allows Redefinition of *Shizoccharomyces pombe* Cell Wall Composition and Structure: Assignment of Diglucan. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 336, n. 2, p. 202-212, 2005.
- MUZZARELLI, R. A. A.; ROCCHETTI, R. The Determination Acetylation Degree of Chitosan by Spectrophotometry. In: MUZZARELLI, R.; JEUNIAUX, C.; GOODAY, G. W. (Ed.). **Chitin in Nature and Technology**. New York, 1986.
- NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The Multitude of Targets for the Immune System and Drug Therapy in the Fungal Cell Wall. **Microbes and Infection**, New York, v. 7, n. 4, p. 789–798, 2005.
- NO, H.K.; MEYERS, S.P. Application of Chitosan for Treatment of Wastewaters. **Review on Environmental Contaminants Toxicology**, New York: 2000. v. 163, p. 1-28.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. v.2, p. 315-318.

PIMENTA, H. C. D.; TORRES, F. R. M.; RODRIGUES, B. S.; JÚNIOR, J. M. R. O Esgoto: A Importância do Tratamento e as Opções Tecnológicas. In: 22º Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 22, 2002, Curitiba. **Anais...**, Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/2500872b247e4e1b03256d03006017c9/38f13d0429d60a5b832574250051cfb9/\\$FILE/O%20esgoto%20-%20a%20import%C3%A2ncia%20do%20tratamento%20e%20as%20op%C3%A7%C3%B5es%20tecnol%C3%B3gicas.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/2500872b247e4e1b03256d03006017c9/38f13d0429d60a5b832574250051cfb9/$FILE/O%20esgoto%20-%20a%20import%C3%A2ncia%20do%20tratamento%20e%20as%20op%C3%A7%C3%B5es%20tecnol%C3%B3gicas.pdf)> Acesso em: 22 nov. 2009.

PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. Cell Wall Analysis, **Methods**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 245- 251, 2004.

RENAULT, F.; SANCEY, B.; BADOT, P.M.; CRINI, G. Chitosan for Coagulation/Flocculation Processes-an Eco-friendly Approach, **European Polymers Journal**, Oxford, v. 45, p.1337–1348, 2009.

RICHARDSON, M.D; SHANKLAND, G.S. *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*, and Other Agents of Systemic and Subcutaneous Zygomycoses. In: MURRAY, P. R. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press. 1995.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. London: MacMillan Press, 1992.

SANDFORD, P. A. Chitosan: Commercial Uses and Potential Application. In SKJAH, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. (Ed.). **Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications**, New York: Elsevier, 1998. p. 51-69.

SCHIGEMASA, Y.; USUI, H.; MORIMOTO, M.; SAIMOTO, H.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S.; SASHINA, H. Applications of Chitin and Chitosan. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdam, v. 34, p. 237-239, 1999.

SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSAHAW, A. Chitosan Functional Properties. **Glycoconjugates Journal**, New York, v. 14, n. 4, p. 535-542, 1997.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and its Derivatives. **Critical Review of Food Science Nutrition**, Colchester, v. 2, n. 43, p.145-171, 2003.

SMITH , G. J.; KAPTEYN , J. C.; VAN DEN ENDE , H.; KLIS , F. M. Cell Wall Dynamics in Yeast. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 348-352, 1999.

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S.M.; KHOR, E. The Chitosan Yield of Zygomycetes at Their Optimum Harvesting Time. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 30, p. 239–242, 1996.

THANOO, B. C.; SUNNY, M, C.; JAYAKRISHNAN, A. Cross-linked Chitosan Microspheres Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release Pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Pharmacology**, Hoboken, p. 283-286, 1991.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical Review in Food Science Nutrition**, Colchester, v. 43, n. 2, p. 61-87, 2003.

TRUFEM, S. F. B. **Diversidade no Reino Fungi: Zygomycota**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Botânica, 2000.

VASCONCELOS, C. L. **Obtenção de Dispersões de Complexos Polieletrólitos a Base de Quitosana e Poli (Ácido Metacrílico) e Análise de Adsorção de Albumina Bovina Sérica**. Natal, 2007. 98p. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

VON ARX, J. A. On Mucoraceae Strains and Other Families of the Mucorales. **Sydowia**, Innsbruck, v. 35, p. 10–26, 1983.

WHITE, S.A.; FARINA, P.R.; FULTON, I. Production and Isolation of Chitosan from *Mucor rouxii*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 38, p. 323–330, 1979.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot Fungi and their Enzymes for the Treatment of Industrial Dye Effluents. **Biotechnology Advances**, Berlin, v. 22, p. 161-187, 2003.

Capítulo II

Primeiro Artigo

Decolorization of Effluent from Soft Drink Industry by Chitosan Powder and Microspheres

Manuscrito publicado
Asian Chitin Journal, 5(1), 93-96(2009)

Decolorization of effluent from a soft drink industry by chitosan powder and microspheres

ADAMARES MARQUES SILVA^{1,3}, EDNALDO R. SANTOS^{1,3}, NEIDE S. R. LOPES SILVA^{1,3}, MARTA C. FREITAS DA SILVA^{2,3} and GALBA M. CAMPOS- TAKAKI³

¹Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP; ²Doutorado em Biologia de Fungos-Universidade Federal de Pernambuco and ³Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, CEP 50.050-590 Recife-Pernambuco, Brasil

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluating the removal of color of the raw soft drinker effluent obtained from industry using chitosan powder and microspheres. The concentration of a chitosan solution was 0.514g for the formulation of chitosan microspheres or powder for applied to removal the color of soft drinker effluent during 168h. The chitosan microspheres formation is helped by the addition of sodium sulphate solution 20% slowly, and followed agitation at 300rpm during 1h. The results showed reduction of the COD by chitosan powder and microsphere and increase the pH. The color remotion obtained was 96 and 98% in 24 h of contact with chitosan. The chitosan microspheres showed 89.72% of efficiency and stability than powder chitosan.

Key word: Chitosan powder, Chitosan microsphere, Industrial effluent, Color removal.

* Corresponding Author: Profa. Dra Galba Maria de Campos-Takaki
Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. UNICAP. Boa Vista Recife - PE
CEP 50050-590 / Fax: 081 2119-4043 - email: takaki@unicap.br

Chitosan is a copolymer formed by β (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxy-D-glycopyranose and β (1 \rightarrow 4)-2-acetamide-2-deoxy-D-glycopyranose, and it has been found to be a promising polymeric material of great scientific interest due to its properties and wide range of application^{10,14}.

The use of biopolymers as adsorbent material it is an emerging technique and of great interest for industrial effluents containing toxic metals, organic solvents and dyes^{6,8}.

Particularly, many studies have been carried out using chitosan in many different forms (powder, microspheres, and fibers) of adsorbents have been employed, including activated carbon, turf, silica, alumina, cellulose and, more recently, chitin and chitosan^{1,3,8,10,12,14}.

The present study was carried out with the preparation of chitosan microspheres and tested in the decolorization of industrial effluent from soft drinks, considering the necessity for decolorization of the raw wastewater. On the other hand, the polymer chitosan it was obtained from chitin, the second compound found abundantly in the nature, after cellulose.

Chitosan: obtained from crabs a shell was purchased from Sigma Co. The effluent was obtained from soft drinks industry (Pernambuco), and showed the following characteristics: COD = 6700mg / L, pH = 4.67, Optical density at 420nm

Preparation of chitosan microspheres:

The microsphere was modified from the literature^{3,4,5}. Chitosan (2.5 g) was dissolved in 100 mL of 2% (m/v) acetic acid under stirring for 18h at room temperature. A viscous solution was obtained and added 1mL of tween-80. Then added to sodium sulphate solution 20% slowly, followed agitation at 500 rpm during 1 hour, until the transmittance it is 0%. The microspheres of chitosan formed were separated by centrifugation at 4000g for 10 minutes and stored in refrigerator.

Color removal test: The effluent was submitted to chitosan microspheres and chitosan powder to removal of the color. a) Erlenmeyer's flasks of 250mL of capacity containing 50mL of soft drinker effluent were added 0.514g of chitosan powder. b) Erlenmeyer's flasks of 250mL of capacity containing 50mL of soft drinker effluent were added 0.514g of chitosan microspheres. All flasks were incubated in shaker at 200rpm, 25°C, during 168h. Aliquots of 5mL were collected at T = 0, T = 24h, T = 48h, and T = 168h for optical densities measured at 420nm spectrophotometer for evaluation of color removal.

The results obtained with the treatment of raw industrial effluent from soft drinker with chitosan powder and microsphere is presented in the table 1.

Table 1: Characterization of raw effluent from soft drinker industry without treatment, and treated with chitosan powder and microsphere

Effluent Characterization						
Time (h)	COD(mg/L)			pH		
	Without treatment	Chitosan powder	Chitosan microspheres.	Without treatment	Chitosan Powder	Chitosan Microspheres
0					5.09	5.01
24	6700	<10	<10	4.67	5.80	5.40
48					5.57	5.28
168		246			6.80	6.55

COD =Chemical Oxygen Demand

The results indicated higher COD in the effluent without treatment and lower pH. However, the treatment with chitosan powder and microspheres reduced significantly the COD value.

The chitosan microsphere showed lower COD value at 24h and the pH increase the value in the presence of chitosan.

The treatment with chitosan powder and microsphere are showed in the table 2. The efficiency of color removal was expressed as a percentage in relation to discoloration of the effluent in comparison with the raw effluent.

Table 2. Color removal from of raw effluent from soft drinker industry without treatment, and treated with chitosan powder and microsphere

Removal of effluent Color (%)

Time (h)	Effluent without treatment (OD_{420nm})	Chitosan Powder	Chitosan Microsphere
0		0	0
24	0% (0.580)	98	97
48		98	98
168		96	98

The results indicated values of optical density corresponding to near total color removal in 24h in both treatment (chitosan powder and microsphere). However, at 168h chitosan powder treatment showed desorption phenomena's, and the percentage was 96%. But the results were

obtained in both treatments demonstrated higher decolorization, similar the literature^{6,7,8,9,11,12,13}. And, it was found that chitosan in microspheres, used in those experiments the chitosan powder, in quantity and efficiency, and was more 89.72% stable in the raw sewage experiments than microspheres. The results obtained is supported by the literature^{1,4,9,11}.

Acknowledgments:

The authors wish to thank to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES-PROCAD (Coordenação de Pessoal de Nível Superior) for support the chitosan research, and the laboratories facilities at UNICAP (Universidade Católica de Pernambuco).

REFERENCES

1. Azevedo V. V. C. , Chaves S. A. , Bezerra, D. C., Fook , M. V , Costa, A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Rev. Eletr. Mater. Proc.. **2**(3):27-34 (2007)
2. Costa Silva, H.S.R., Coelho, J.F.J., Gilb, M. H and Ferreira, E.I.. Synthesis and characterization of chitosan microspheres by using genipin as a crosslinking agent
3. Denkba, E.B. , Odaba, M. Chitosan microspheres and sponges: Preparation and characterization. [J. Appl. Poly. Sci.](#) **76** (11): 1637 – 1643, 2000
4. Dubey, R. R. and Parikh, R. H. Two-Stage Optimization Process for Formulation of Chitosan Microspheres. *AAPS PharmSciTech.* **5** (1): 1-9 (2004)
5. Kamin' ski, K.; Zazakowny, K.; Szczubiałka, K. and Nowakowska, M. pH-Sensitive Genipin-Cross-Linked Chitosan Microspheres For Heparin Removal Biomacromolecules, **9** (11):3127-3130-3132, (2008)
6. Kimura, I.Y., Fávere, T.F. ,Martins, O.A., Spinelli, V.A., Josué, A. Adequacy of isotherm adsorption of black 5 reactive dye for crosslinked chitosan microspheres. *Acta Scientiarum.* **23**(6):1313-1317(2001).

7. Laus, R., Mauro C. M., Martins, A. e Fávere, V.T. microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(iii) e manganês(ii) de águas contaminadas pela mineração de carvão. *Quim. Nova*, **29**(1):34-39(2006).
8. Laszlo, J. A. Removing acid dyes from textile wastewater using biomass for decolorization. *Am. Dyest. Rep, Secancus*, v. 83, p. 17, 1994.
9. Mckay, G. Waste color removal from textile effluents. *Am. Dyest. Rep.*, Secancus, v. 86, n. 4, 29-36, 1979.
10. Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C. (Eds.). *Chitosan in pharmacy and chemistry*. **2002**. Atec: Grottamare, 524pg.
11. Nawar, S.S.; Doma, H.S. Removal of dyes from effluents using low-cost agricultural by-products. *Sci.Total Environ.*, Amsterdam, v. 79, p. 271-275, 1989.
12. Poots, V.J.P. *et al.* The removal of acid dye from effluent using natural adsorbents – Part I *Peat. WaterResearch, Kidlington*, **10**:1067-1070 (1976).
13. Azevedo V. V. C. , Chaves S. A. , Bezerra, D. C.,Fook , M. V , Costa, A. C. F. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Rev. Eletr. Mater. Proc.* **2**(3):27-34 (2007)
14. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **31**, 603–632, 2006.

Capítulo III

Segundo Artigo

**Produção de quitosana por *Absidia corymbifera*
UCP 134 em fermentação submersa e aplicação na
descoloração de efluente industrial**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico

Bioresource Technology

Produção de quitosana por *Absidia corymbifera* UCP 134 em fermentação submersa e aplicação na descoloração de efluente industrial

Marques Silva, A., Sérgio Paiva, Clarissa D. Costa de Albuquerque e Galba Maria de Campos-Takaki *

Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. CEP 50050-590. Boa Vista Recife – PE, Brasil. Fone/Fax: +55 8121194017 - 2119-4043 E- mail: takaki@unicap.br

RESUMO

Estudos foram realizados com a produção de quitosana por *Absidia corymbifera* empregando um planejamento fatorial de 2^3 , tendo como variáveis independentes milhocina, glicerina e uréia, visando a formulação de um meio de baixo custo. Os experimentos realizados demonstraram uma ótima produção de biomassa por *A. corymbifera*, correspondendo a 21g/L, em 96h de cultivo. No mesmo período observou-se uma produção máxima de quitosana, no ponto central do planejamento fatorial, correspondendo a 88mg/g de biomassa. A quitosana obtida por tratamento álcali-ácido solúvel demonstrou 90,3% de deacetilação, com índice de cristalinidade de 21%. A aplicação da quitosana na descoloração do efluente industrial apresentou um alto poder de adsorção, apresentando 100,0% de descoloração do efluente, com uma redução de DQO (Demanda Química de Oxigênio) de 99,8% e 90,0% de SST (Sólidos Suspensos Totais). Os resultados obtidos indicaram a formulação de um meio de baixo custo para a produção de biomassa e de quitosana, levando em consideração ainda, o reaproveitamento de resíduos industriais, a alta eficiência da quitosana na redução da cor, na DQO e em SST, no tratamento de efluentes industriais.

Palavras chaves: *Absidia corymbifera*, Quitosana, Efluente Industrial, Adsorção.

*Autor para correspondência: Profa. Dra Galba Maria de Campos-Takaki

Rua Nunes Machado, 42, Bloco J. UNICAP. Boa Vista Recife - PE

CEP 50050-590 / Fax: 081 2119-4043 - email: takaki@unicap.br

1. Introdução

Avanços recentes em tecnologias de fermentação sugerem que a biomassa de determinados fungos podem proporcionar uma fonte alternativa de quitosana. Contudo, a obtenção desse polissacarídeo depende de algumas condições, tais como a espécie de fungos, tempo de cultivo, pH, aeração e temperatura. Portanto, os fungos filamentosos da ordem Mucorales têm sido considerados uma atraente fonte de quitosana para aplicações industriais, considerando que o produto específico, quitina ou quitosana, podem ser produzido sob condições controladas e padronizadas (Pochanavanich and Suntornsuk, 2002; Synowiecki and Al-Khatteb, 2003; Stamford et al., 2003; Attia et al., 2006;). Neste sentido, a classe Zygomycetes torna-se promissora considerando a quantidade de quitina e quitosana presentes em suas paredes celulares, quando comparadas à outras classes de fungos (Leng, 1996; Tan et al., 1996; Campos- Takaki, 2005).

A quitosana vem se destacando como um biopolímero com alta capacidade de adsorção, quando comparada ao carvão ativado, podendo ser utilizada nos mais diversos tipos de tratamentos. Assim, as investigações realizadas com adsorção por quitosana abordam aplicações gerais no tratamento de efluentes, tais como: remoção de microrganismos poluidores, redução de parâmetros como Demanda Química de Oxigênio (DQO), Sólidos Suspensos Dissolvidos (SSD), Sólidos Suspensos Totais (SST), remoção de nutriente (fósforo) e da cor (Cogate et al., 2004; Franco et al., 2004; Chin et al., 2006).

O termo adsorção foi proposto por Bois-Reymond (1848) e introduzido na literatura por Kayser (1975), o qual também implementou alguns conceitos teóricos que se tornaram a base da teoria da adsorção monomolecular. As primeiras observações quantitativas de fenômenos associados foram reportadas por Scheele (1773, apud Fauque, 1995) e Fontana (1777, apud, Fauque, 1995), como a remoção de gases por carvão e argilas. Assim, aplicações modernas deste fenômeno foram possíveis por meio de observações feitas por Lowitz quando fez uso de carvão ativado, como adsorvente para a remoção de impurezas orgânicas em soluções de ácido tartárico (1785, apud, Dabrowski, 2001). A adsorção apresenta vantagens quando comparada a outras formas de tratamento. Obtendo um efluente de alta qualidade, com um baixo custo e sem produzir substâncias tóxicas, ozônio e radicais

livres (existentes nos processos de fotodegradação com ultra violeta). Neste sentido, é possível evitar a formação de lodos ativados (típicos de tratamentos biológicos), e ainda, remover corantes de soluções diluídas (Bhattacharyya e Sarma, 2003; Charterjee et al., 2005, Campos- Takaki, 2005). Neste trabalho foi investigado o potencial biotecnológico de *Absidia corymbifera* na produção de biomassa e quitosana a partir de resíduos industriais (glicerina obtida do excedente da produção do biodiesel), milhocina (resíduo do beneficiamento do milho), como também uréia, como meio de meio de baixo custo. Os estudos foram realizados utilizando um planejamento fatorial completo de 2^3 , avaliando as interações entre os componentes dos meios, tendo como variável resposta o aumento da produção de biomassa e de quitosana, visando aplicação no processo de descoloração de efluente industrial de refrigerantes e sucos.

2. Métodos

2.1. *Microrganismo*

O microrganismo utilizado nesse trabalho foi a linhagem *Absidia corymbifera* (UCP 134), depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB, Universidade Católica de Pernambuco -UNICAP, sendo mantida no meio BDA, 5°C.

2.2. *Condições de cultivo e produção de Biomassa*

A. corymbifera foi transferida para placas de Petri 9cm de diâmetro, contendo o meio BDA, Batata Dextrose Agar, (32g/L adicionados a 1000mL de destilada e pH 5,8), incubadas à temperatura de 37°C, por 12h, para obtenção de uma cultura jovem. Discos de micélios jovens foram cortados com auxílio de um furador de rolha (6mm de diâmetro), correspondendo a um pré inóculo de 3,2g, sendo transferidos com auxílio de alça de platina para frascos de Erlenmeyer de 250mL de capacidade, contendo 50mL de meio, com pH ajustado para 5,8 preparados de acordo as especificações do planejamento fatorial 2^3 , descrito na Tabela 1. Os frascos foram incubados à temperatura de 37°C, sob agitação orbital de 150rpm. Após 24h de

crescimento foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 1000 mL de capacidade contendo 550 mL de meio com as mesmas composições especificadas na (Tabela 1). Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, à temperatura de 37°C, por um período de 96 horas. O pH e consumo da fonte de carbono foram determinados a partir do filtrado.

2.3. Avaliação estatística dos efeitos e interações das concentrações de glicerina, milhocina e da e uréia sob a produção de quitosana

Planejamento fatorial completo 2^3 , composto por 8 ensaios e 4 repetições no ponto central foi realizado para analisar os efeitos principais e interações das variáveis independentes, concentração de uréia, glicerina e milhocina, sobre as variáveis respostas rendimento de biomassa e rendimento de quitosana. Os níveis e valores das variáveis independentes estudadas estão apresentados na Tabela 1.

2.4. Determinação da Biomassa

Ao final da fermentação o micélio foi separado por filtração, sendo a massa celular lavada com água destilada estéril, gelada, e submetida à liofilização. Em seguida, foi mantida em dessecador até peso constante. A biomassa foi determinada por gravimetria e expressa em g/L.

2.5. Determinação de densidade ótica do efluente bruto

A densidade ótica foi verificada usando espectrofotômetro Spectronic Genesyz no comprimento de onda de 570 nm.

2.6. Determinação do pH

O pH do líquido metabólico livre de células foi determinado por potenciometria.

2.7. Determinação da glicose

O consumo de glicose foi determinado a partir do líquido metabólico livre de células, pelo método enzimático colorimétrico (Henry et al., 1974).

2.8. Cinéticas de produção de biomassa, quitosana e consumo de glicose

Frascos de Erlenmeyers de 1000 mL contendo 600 mL de meio, com a mesma composição do ponto central do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 1), com pH 5,8, foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, à temperatura de 37°C, por um período de 96 horas. Determinações de glicose, biomassa e quitosana foram realizadas com 0, 6,12, 48 , 72, e 96 horas. A biomassa obtida foi submetida posteriormente a extração da quitosana. Os perfis cinéticos de glicose, biomassa e quitosana foram construídos usando médias de triplicatas obtidas com 0, 6,12, 48 , 72, e 96 horas.

2.9. Extração da Quitosana

A Quitosana foi extraída da biomassa obtida de *Absidia corymbifera*, de acordo com a metodologia de Jin Hu, et al.(1999). O processo envolve a desproteíntização por hidróxido de sódio 1M (p/v), seguido de centrifugação, hidrólise ácida, com ácido acético 2% (3v/p), centrifugação, para obtenção de quitina e quitosana e 3 lavagens sucessivas com água e soro fisiológico até neutralização.

2.10. Caracterização da Quitosana

A quitosana obtida após o processo de otimização, foi caracterizada através dos métodos Espectroscopia ao raio Infravermelho, determinação do grau de deacetilação (GD%) e difração de Raios-X.

2.11. Espectroscopia ao Raio Infravermelho – IR

As análises de infravermelho (FTIR) da quitosana foram realizadas no Espectrofotômetro Bomem – modelo B100 do Instituto de Química - UNICAMP, para identificar as bandas características da amostra a partir de pastilhas de KBr (0,5%).

O teor de deacetilação foi determinado através das bandas de absorção em 1655 e 3450 cm^{-1} , às quais estão associadas às carbonilas dos grupos N-acetil remanescentes da quitina e hidroxila, respectivamente.

2.12. Grau Deacetilação (GD%)

O grau de deacetilação da quitosana foi determinado usando espectroscopia ao raio infravermelho - IR, aplicando a faixa A_{1655}/A_{3450} e calculado de acordo com a seguinte equação:

$$GD\% = 97,67 - [26,486 (A_{1655} / A_{3450})] \quad (1) \quad [\text{Lima et al., 2006}]$$

Onde A_{1655} = Absorbância a 1655 cm^{-1} e Absorbância a 3450 cm^{-1}

2.13. Difração de Raios-X

As medidas de difração de raios-X foram realizadas em difratômetro de raios-X, modelo XRD 7000 do Instituto de Química – UNICAMP, onde uma alíquota da amostra foi transferida para a lâmina e levada ao suporte do difratômetro para realização da análise.

2.14. Índice de Cristalinidade $I_{CR}(\%)$

Para cálculo do índice cristalinidade foi utilizada a seguinte equação (2):

$$I_{CR}(\%) = \{ [I(\theta_c) - I(\theta_a)] / I(\theta_c) \} \times 100 \quad (2) \quad [\text{Kittur et al., 2005}]$$

Onde $I(\theta_c)$ é a intensidade relativa às regiões cristalinas ($2\theta=20^\circ$), e $I(\theta_a)$ corresponde às regiões amorfas ($2\theta = 12^\circ$), para quitosana.

2.15. Caracterização e descoloração do Efluente Industrial

O efluente industrial bruto obtido de indústria de refrigerantes, foi caracterizado antes e após processo de descoloração, determinando-se os seguintes parâmetros:

2.15.1 Demanda Química de Oxigênio – DQO

Antes e após adsorção com quitosana fúngica, foram pipetados 3 ml de efluente e transferidos à cubetas (kit Merck) para determinação de DQO. O sistema

então foi homogeneizado e levado ao termoreator a 148°C durante 02 horas. Após atingir temperatura ambiente realizou-se determinação da DQO, introduzindo a cubeta do KIT no aparelho Spectroquant Nova 60 Merck.

2.15.2 Potencial de Hidrogênio Iônico – pH

A determinação do pH das amostras do efluente antes e após descoloração, foram determinados por potenciometria, através do potenciômetro ORION model 310, calibrado previamente com com soluções tampões pH 7,0 e 4,0.

2.15.3 Sólidos Suspensos Totais – SST

Filtros de 0,45µm, foram acoplados ao sistema de filtração, sendo submetidos a adição de água destilada e levados à mufla a 550°C, durante 30 minutos. Em seguida, esfriado em dessecador até estabilização do peso (P_1). Logo após membranas com alíquotas do efluente antes e após descoloração, foram levados ao aparelho de filtração. Após, os papéis de filtro foram levados à estufa (103 – 105°C), com auxílios de placas de Petri, durante 2 horas. As amostras foram esfriadas em dessecador até peso constante (P_2). De acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater (1998) a seguinte fórmula foi utilizada para determinação dos sólidos suspensos totais:

$$SST (mg/L) = (P_2 - P_1) / V. 1000 000 \quad (3)$$

Onde V é o volume da amostra em mL.

2.15.4. Descoloração do Efluente

Os ensaios para avaliar a remoção de cor foram realizados em frascos de Erlenmeyers de 250mL de capacidade, contendo 100mL do efluente bruto, nas condições de agitação, tempo de contato e concentração de (Tabelas 3 e 4). Para cada tempo de contato estabelecido no planejamento foram retiradas amostras de 10 mL, submetidas à centrifugação de 5.000 g, por 20 minutos, e em seguida determinada a cor em espectrofotômetro a 550nm devido ao scanner do efluente

realizado previamente. A porcentagem de descoloração do efluente foi calculada através da seguinte fórmula, de acordo com De acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater (1998):

$$\text{Remoção de cor (\%)} = (1 - B/A).100 \quad (4)$$

Onde: A= absorbância do efluente bruto

B= absorbância após os diversos tratamentos

3. Resultados e Discussão

Os resultados de consumo de glicose, produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH final dos meios de produção estão apresentados na Tabela 2, juntamente com a matriz descodificada do planejamento fatorial completo 2³.

3.1. Influência de glicerina, milhocina e uréia na produção de biomassa.

No diagrama de Pareto estão descritos os efeitos padronizados ilustrados na Figura 1, pode-se observar que o aumento da concentração de uréia produziu um efeito negativo, estatisticamente significativo, sobre o aumento do rendimento da biomassa produzida, ou seja, o aumento da concentração de uréia desfavoreceu significativamente o aumento da biomassa. Os demais fatores investigados, i.e., a concentração de glicerina e a concentração de milhocina, não exerceram isoladamente efeitos significativos, do ponto de vista estatístico sobre o aumento do rendimento da biomassa. As interações entre a uréia e a glicerina, entre a uréia e a milhocina e entre a glicerina e a milhocina também não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento da biomassa. Contudo, Cardoso (2007) relata ocorrência de uma maior produção de biomassa (16,7g/L) do fungo *Rhizopus arrhizus*, por fermentação submersa, apenas com milhocina a 8%, demonstrando que a milhocina pode funcionar como substrato essencial para o aumento da produção de biomassa.

3.2. *Influência de glicerina, milhocina e uréia na produção de quitosana.*

No diagrama de Pareto estão descritos os efeitos padronizados ilustrados na Figura 2, pode-se observar que o aumento da concentração de uréia produziu um efeito negativo estatisticamente significativo sobre o aumento do rendimento da quitosana produzida, ou seja, o aumento da concentração de uréia desfavoreceu com significância estatística o aumento do rendimento de quitosana. No entanto, o aumento da concentração de glicerina, o aumento da concentração de milhocina e as interações entre a glicerina e a milhocina, entre a uréia e a milhocina e entre uréia e a glicerina não apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre o rendimento da quitosana. Também foi observado que o aumento da concentração de uréia produziu um efeito negativo estatisticamente significativo sobre o aumento do pH final dos meios de produção (Figura 3). Os demais fatores e interações não exerceram efeitos significativos, do ponto de vista estatístico, sobre o pH final dos meios de produção.

3.2.3. *Identificação do melhor meio de cultivo para produção de quitosana*

A análise dos resultados obtidos no planejamento (Tabela 2) permite observar que o maior consumo de glicose (99,9%), a maior produção de biomassa (21g/L) e o maior rendimento de quitosana (102 mg/g) foram obtidos no ponto central do planejamento, usando 0,25% (p/v) de uréia, 6% (v/v) de glicerina e 6% (v/v) de milhocina.

O consumo médio de glicose, a produção média de biomassa, o rendimento médio de quitosana e o pH final dos meios de produção, nos ensaios realizados no ponto central do planejamento, foram respectivamente iguais a $99,8 \pm 0,09\%$; $17,25 \pm 3$, $83,75 \pm 16,17$ mg/g e $7,13 \pm 0,25$.

Nos ensaios 4 e 6 do planejamento, onde a concentração de uréia foi usada em seu nível superior (0,5% p/v) com a concentração de milhocina (4% v/v) ou a concentração de glicerina (5%v/v), em seu nível inferior, os pHs finais dos meios de produção foram respectivamente iguais a 8,5 e 8 e o consumo de glicose, o rendimento de biomassa e o rendimento de quitosana iguais a zero. Estas

informações são apoiadas pelas investigações realizadas por Nwe (2004), cujos dados revelam que quanto maior a concentração de uréia, menor a produção de biomassa e que ainda, as concentrações de uréia acima de 15g/kg de substrato inibem o crescimento microbiano.

Entretanto, no ensaio 8 do planejamento, onde a concentração de uréia foi usada em seu nível superior (0,5% p/v), mas a concentração de glicerina (7%v/v) e a concentração de milhocina (8% v/v) foram usadas em seus níveis superiores; o pH final do meio foi igual a 7,5 e o consumo de glicose, o rendimento de biomassa e o rendimento de quitosana foram respectivamente iguais a 73,22%; 17g/L e 52mg/g. Estes resultados mostram que a uréia exerce um efeito significativo sobre a produção de quitosana, já que inibe o consumo de glicose, a produção de biomassa e a produção de quitosana, ao aumentar o pH dos meios de produção para 8,0 ou mais, sem que o efeito das interações entre as concentrações de glicerina e milhocina seja capaz de reduzi-lo.

Nos ensaios 1, 3, 5 e 7 do planejamento que não usaram uréia, o consumo de glicose, a produção de biomassa e a produção de quitosana foram inferiores as obtidas no ponto central do planejamento e o pH dos meios de produção foram iguais ou inferiores a 7,0. Portanto, entre as condições estudadas no planejamento realizado a melhor condição para produção de biomassa e de quitosana foi a do ponto central.

3.3. Perfis cinéticos de consumo de glicose e crescimento de *A. corymbifera*

A biomassa de *A. corymbifera* UCP 134 obtida em meio de cultivo constituído de 6% de glicerina, 6% de milhocina e 0,25% de uréia (ponto central do planejamento fatorial 2³) foi utilizada para construir o perfil de crescimento do fungo em estudo. Os perfis de consumo de glicose e crescimento de *A. Corymbifera* no referido meio estão ilustrados na Figura 4. Os resultados obtidos evidenciaram que na fase de adaptação celular, correspondente ao período de 0 a 12 h, houve um baixo consumo de glicose e que na fase exponencial (24-72 h) este consumo foi de aproximadamente 70%.

A maior produção de biomassa, 21g/L, ocorreu com 96 h, no fim da fase estacionária, coincidindo com o esgotamento da fonte de carbono (glicose). Esses

dados são apoiados pelas informações de Stamford et al. (2007) que obteve rendimentos significativos de biomassa correspondendo a 24,3 g/L utilizando *Cunninghamella elegans* crescida no turbéculo Jacatupé.

Cardoso et al.(2007) utilizando apenas 8% de milhocina como meio para crescimento de *Rhizopus arrhizus* obteve produção de 16,8 g/L de biomassa em 72 horas de cultivo. Investigações realizadas por Andrade et al. (2000) e Carvalho (2000) usando *C. elegans* demonstraram altos rendimentos de biomassa (11,0 e 13g/L, respectivamente), sendo esses resultados inferiores aos descritos neste trabalho.

3.4. Produção e caracterização da Quitosana

A cinética de produção da quitosana por *A. corymbifera*, em meio contendo 6% milhocina, 6% glicerina e 0,25% uréia, encontra-se ilustrada na Figura 5. Os resultados obtidos mostram que a produção de quitosana, está diretamente associada ao crescimento celular. Durante as primeiras 24 h (fase de adaptação celular) praticamente não houve produção de quitosana. Entretanto, durante as fases de crescimento exponencial e estacionário houve um aumento crescente da produção de quitosana. O maior rendimento de quitosana (88mg/g) foi obtido no final do processo, com 96 horas de produção. Cardoso et al. (2009) cultivaram *Rhizopus arrhizus*, em meio contendo 8% de milhocina, durante 72 horas e obtiveram rendimento de quitosana de 416 mg/g de biomassa. Por outro lado, Stamford et al.(2007) obtiveram rendimento de quitosana correspondente a 66 mg/g de biomassa; cultivando *C. elegans* (UCP 542), durante 96 horas, em meio a base de Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban), contendo 8.72 g/L de proteínas totais, 40.9 g/L de amido e 11.14 g/L de glicose, com pH ajustado para 7,0.

A cinética de produção da quitosana por *A. corymbifera*, em meio contendo 6% milhocina, 6% glicerina e 0,25% uréia, encontra-se ilustrada na Figura 5. Os resultados obtidos mostram que a produção de quitosana, está diretamente associada ao crescimento celular. Durante as primeiras 24 h (fase de adaptação celular) praticamente não houve produção de quitosana. Entretanto, durante as fases de crescimento exponencial e estacionário houve um aumento crescente da produção de quitosana. O maior rendimento de quitosana (88 mg/g) foi obtido no

final do processo, com 96 horas de produção. Cardoso et al. (2009) cultivaram *Rhizopus arrhizus*, em meio contendo 8% de milhocina, durante 72 horas e obtiveram rendimento de quitosana de 416 mg/g de biomassa. Por outro lado, Stamford et al.(2007) utilizando *C. elegans* (UCP 542) cultivadas em meio a base de Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban)- composição química básica [proteínas totais (8.72 g), Amido (40.9 g) e glicose (11.14 g) por litro de água destilada, pH 7.0], durante 96 horas, obtiveram rendimento de quitosana correspondente a 66 mg/g de biomassa.

As análises de espectroscopia na região do infravermelho das amostras de quitosana produzidas por *A. corymbifera* no ponto central do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 1) e de quitosana comercial (Polymar), foram realizadas para determinação do grau de deacetilação, de acordo com Lima et al.(2006). Os graus de deacetilação (GD) de quitosana microbiológica e de crustáceos obtidos foram iguais a 90,3% e 78,59%, respectivamente. O grau de deacetilação da quitosana microbiológica obtido através de espectros na região do infravermelho, excede 11,71% comparando-se com a amostra comercial analisada (Figura 6 e 7). Pode-se observar que na região de impressão digital ($1400 - 900 \text{ cm}^{-1}$) do infravermelho são distinguíveis as bandas amina I ($1620 - 1650 \text{ cm}^{-1}$) e amina II ($1570 - 1590 \text{ cm}^{-1}$), as quais são bandas características da estrutura química de quitosana. Essas bandas são vistas tanto no espectro da quitosana utilizada nesse trabalho, como padrão (Polymar), na região do infravermelho, confirmando que a quitosana produzida por *A. corymbifera* assemelha-se ao padrão comercial.

Os índices cristalinidade (I_{CR}) obtidos através da difração de raio-X, da amostra de quitosana na melhor condição do planejamento fatorial utilizado e a da quitosana comercial (Polymar), utilizada como padrão, foram calculados de acordo com Kittur et al.(2005), sendo obtidos respectivamente iguais a 21 e 56,64%. Os difratogramas de raio-X das referidas amostras estão ilustrados nas Figuras 8 e 9, confirmando o alto grau de deacetilação da quitosana produzida por *A. corymbifera* de acordo com Vikhoreva et al.(1999).

3.5. Descoloração do efluente indústria

Os efeitos da dosagem de quitosana e tempo de contato foram investigados para avaliar a capacidade de adsorção no processo de descoloração do efluente industrial bruto (Tabela 3). A Demanda Química de Oxigênio (DQO), Densidade Óptica (COR), Sólidos Suspensos Totais (SST), Potencial de Hidrogênio Iônico (pH), são parâmetros considerados importantes em tratamento de águas residuárias, por isso foram utilizados como indicadores para avaliar a capacidade de adsorção da quitosana.

As características obtidas do efluente antes e após adsorção por quitosana foram descritas nas Tabelas 5 e 6. O melhor efeito da dosagem de quitosana para o processo de adsorção foi analisado com o efluente em pH 4,3 (Tabelas 5, 6 e 7), durante 30min de contato, correspondendo aos ensaios 1 e 2 (Tabela 4), onde foi verificado que para obtenção desse alto índice de remoção de poluentes não foi necessário nenhuma agitação (Figura 10) para ocorrer o processo de adsorção. A melhor eficiência obtida foi de 100% na remoção de parâmetros correspondentes a Densidade óptica (COR), 99,8% de DQO (demanda química de oxigênio), 90% de SST (sólidos suspensos totais).

Os resultados obtidos demonstraram valores semelhantes aos sugeridos por Xin et al.(2006), no que se refere ao índice de descoloração, onde o mesmo alcançou uma taxa de 99% em condições ótimas, utilizando uma combinação de coagulante com quitosana. Marques Silva, A. et al. (2009) obteve resultados ótimos de 98% na remoção da cor de efluentes industrial de refrigerantes e sucos, utilizando quitosana comercial de crustáceos.

Ying-Chien (2005) trabalhando com águas residuárias obteve remoção de Sólidos Suspensos Totais e DQO, correspondentes a 62,6% e 62,8%, respectivamente. Investigações recentes utilizando quitosana para remover poluentes em efluentes foram realizadas por Milhome et al.(2009), sendo obtida 65% na remoção da demanda química de oxigênio (DQO), sendo esses resultados inferiores aos obtidos nesse trabalho.

Quitosana tem sido utilizada em experiências para tratamento de águas residuais de destilarias, com diferentes quantidades de tempo e contato, demonstrando que 10g/L desse biopolímero, e um tempo de contato de 30 minutos

podem estar adequados para purificação das águas residuais, tendo como um dos índices de eficiência a demanda química de oxigênio (Lalov et al., 2002).

4. Conclusões

A. corymbifera é capaz de crescer e produzir quitosana nos substratos glicerina (resíduo industrial do excedente da produção do biodiesel), associada a milhocina e uréia, possibilitando a formulação de um meio de baixo custo. A quitosana produzida por *A. corymbifera* apresenta um alto grau de deacetilação e baixo índice de cristalinidade, confirmando assim a alta porcentagem de deacetilação, com picos de absorção ao raio infravermelho próximos ao padrão comercial, alta eficiência na descoloração, demonstrando potencial biotecnológico para a remoção de poluentes de efluentes industriais.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio PROCAD-CAPES e ao suporte financeiro FINEP e CNPq, como também o acesso aos laboratórios da UNICAP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, V. S.; Neto, B.B.; Souza, W.; Campos-Takaki, G.M. , 2000. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Microbiol.* 46, 1042-1045.

Attia, A.A.; Rashwan, W. E.; Khedr, S. A., 2006. Capacity of activated carbon in the removal acid dyes subsequent to its thermal treatment. *Dyes Pigments* 69,128-136.

Bhattacharyya, K.G.; Sarma, A., 2003. Adsorption characteristics of the dye, rilliant green, on neem leaf powder. *Dyes Pigments*, v. 57, 211-222.

Cardoso, A., 2007. Produção de Quitina e Quitosana em cultura submersa de *Rhizopus Arrhizus* nos meios milhocina e sintético para mucorales. Dissertação de Mestrado.

Carvalho, R.C.G. , 2000. Produção de quitina por *Cunninghamella elegans* e sua aplicação na reabilitação de lesões experimentais. Dissertação de Mestrado.

Campos-Takaki, G. M., 2005. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: DUTTA, P.K. ed. *Chitin and chitosan opportunities and challenges*, India, SSM:International Publication, 69-94.

Chatterjee, S. et al., 2005. Adsorption of a model anionic dye, eosin Y, from aqueous solution by chitosan hydrobeads. *J. Colloid Interface Sci.* 288, 30-35.

Cogate, P. R.; Pandit, A. B., 2004. A review of imperative technologies for waster treatment I: oxidation technologies at ambient condition. *Adv. Environ. Res.* 8, 501-551.

Fauque, D. O papel iniciador de Lavoisier., 1995. *Química Nova* 18, 567-573.

Franco, L. de O.; Maia, R. de C. G.; Porto, A. L. F.; Messias, A. S.; Fukushima, K.; Campos-Takaki, G. M., 2004. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated

from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, July-September, 35, 3, 243-247.

Greenberg, Arnold E., 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20^a ed. Washington: American public health association.

Henry, R. J.; Cannon, D. C.; Winkelman, J. W. , 1974. *Clinical Chemistry*, Row: New York, principles and technics. 2^a ed., Happer.

Hu, Ke-Jin et al., 1999. Rapid extraction of high-quality chitosan from. *J Of Food Biochemistry*, Hong Kong, 23 fev, 187-196.

Lalov, I. G.; Guerginov, I.I.; Krysteva, M.A.; Fartsov, K. , 2002. Tratamento de águas residuais as destilarias com quitosana. *Water research*, 34, 1503-1506.

Leng, C. C.; Pinto, N.G. , 1996. An investigation of the mechanisms of chemical regeneration of activated carbon. *Ind. Eng. Chem. Res.*

Lima, I. S.; Ribeiro, E. S.; Airoidi, C., 2006. O emprego da quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. *Quim. Nova* 29, 3, 501-506.

Kaiser; Gotz; Schoch; Tölg., 1975. *Talanta*. 22, 889-899.

Kittur, A. A.; Kulkarni, S.S.; Aralaguppi, M.I., 2005. Preparation and characterization of novel pervaporation membranes for the separation of water–isopropanol mixtures using chitosan and NaY zeolite. *J. of membrane science* 75-86.

Nemtsev, S.V.; Zueva, O. Yu; Khismatullin, M.R.; Albulov, A.I. and Varlamov, V.P., 2004. Isolation of chitin and chitosan from honeybees. *Applied Biochemistry and Microbiology*, January, 40, 1, 39-43.

Nwe, N.; Stevens, W. F. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation.,2004. *Bioprocess Technology* 39, 1639-1642.

Pochanavanich, P. and Suntornsuk, W., 2002. Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*, July, 35, 1, 17-21.

Synowiecki, Józef and Al-Khatteb, Nadia Ali Abdul. , 1997. Mycelia of *Mucorrouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*, 60, 4, 605-610.

Synowiecki, Józef and Al-Khatteb, Nadia Ali Abdul., 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43, 2, 145-171.

Stamford, T.C.M.; Stamford, T.L.; Stamford, N.P.; Neto, B.B.; Campos-Takaki, GM., 2007. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Eletronic J. Biotechnol.* 10, 65.

Tan, Su Ching; Tan, Teck Koon; Wong, Sek Man and Khor, Eugene., 1996. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers*. 30, 4, 239-242.

Wu, F. C.; Tseng, R. L.; Juang, R.C., 2000. Comparative adsorption of metal and dye on flake and bead-types of chitosans prepared from fishery wastes. *J. Hazard. Mater.* 73, 63-75.

MARQUES SILVA. A.; EDNALDO, R. S.; NEIDE, R. L. S.; Marta. C. F. S.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; CAMPOS TAKAKI. G. M., 2009. Decolorization of effluent from a soft drink industry by chitosan powder and microspheres. *Asian Chitin J.*, 5, 1, 93-96.

Milhome, M. A. L; Keukeleire, D.; Nascimento, R.F.; Ribeiro, J.P., 2009. Remoção de poluentes de fenol provenientes de tratamento de efluentes por Quitina e Quitosana. *Quím. Nova* 32, 8, 2122-2127.

Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Use of Sugar. *Analytical Chemistry* 31, 3, 426-428.

Vikhoreva, G.A.; Gorbacheva, I.N.; Galbraikh, L.S., 1999. Synthesis and properties of water-soluble derivatives of chitin: a review. *Fiber Chem*, 31, 573–8493.

Xin, C.; Hui-Li, S.; Jia-Hui, P., 2006. Descoloração de efluentes de tingimento com uso de materiais de quitosana. Foshan University.

Ying-Chien, C.; Ele, Y.; Chiing-Chang, C., 2005. Remoção de Poluentes de Águas Residuais da Aqüicultura usando o Biopolímero Quitosana com diferentes pesos moleculares. *J. Environmental Science and Health*, 40, 1775-1790.

Tabela 1 – Valores das variáveis independentes, níveis -1 e +1 e do ponto central

Variável Independente	Nível		
	-1	0	+1
Uréia (%p/v)	0,00	0,25	0,50
Glicerina (%v/v)	5,00	6,00	7,00
Milhocina (%v/v)	4,00	6,00	8,00

Tabela 2 – Matriz do planejamento 2³ decodificada e resultados da fermentação de *Absidia corymbifera*: consumo de glicose, produção de biomassa, rendimento de quitosana e pH

Nível	Uréia (%p/v)	Glicerina (%v/v)	Milhocina (%v/v)	Consumo Glicose (%)	Produção de Biomassa (g/L)	Rendimento Quitosana (mg/g)	pH Final
1	0,00	5,00	4,00	93,14	15,00	61,00	6,50
2	0,50	5,00	4,00	0,00	0,00	0,00	8,00
3	0,00	7,00	4,00	96,20	17,00	48,00	7,00
4	0,50	7,00	4,00	0,00	0,00	0,00	8,50
5	0,00	5,00	8,00	99,04	21,00	23,00	6,50
6	0,50	5,00	8,00	0,00	0,00	0,00	8,00
7	0,00	7,00	8,00	95,12	19,00	69,00	7,00
8	0,50	7,00	8,00	73,22	17,00	52,00	7,50
9	0,25	6,00	6,00	99,69	18,00	85,00	7,50
10	0,25	6,00	6,00	99,86	17,00	88,00	7,00
11	0,25	6,00	6,00	99,90	13,00	82,00	7,00
12	0,25	6,00	6,00	99,79	21,00	85,00	7,00

Tabela 3. Níveis e valores das variáveis independentes do 1º planejamento fatorial 2²

Variável Independente	Nível		
	-1	0	+1
Concentração da quitosana (g/L)	5	7,5	10
Agitação (rpm)	0	75	150

Tabela 4. Matriz codificada de planejamento fatorial completo 2². Fatores: concentração da quitosana produzida por *Absidia corymbifera* e agitação. Variável resposta: remoção da cor do efluente (%)

Ensaio	Concentração da quitosana (g/L)	Agitação (rpm)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0

Tabela 5 – Demanda Química de Oxigênio e Sólidos Suspensos Totais do efluente industrial antes e após descoloração - Tempo de contato da Quitosana 30min

Ensaio	Dosagem Quitosana (g/L)	DQO (mg/L) Antes adsorção	DQO (mg/L) Após adsorção	Sólidos Suspensos Totais (mg/L) - Antes adsorção	Sólidos Suspensos Totais (mg/L) - Após adsorção
1	10				
2	5	5800	<10	100	<10

Tabela 6 – Densidade óptica e pH do efluente industrial antes e após descoloração

Densidade óptica e pH - Tempo de contato da Quitosana 30min					
Ensaio	Dosagem de Quitosana (g/L)	pH inicial	pH final	Densidade Óptica Antes Adsorção (nm)	Densidade Óptica Após Adsorção 550(nm)
1	5		5,20		0,000
2	10		5,95		0,000
3	10		6,35		0,002
4	10	4,30	6,47	0,104	0,002
5	7,5		5,95		0,004
6	7,5		5,90		0,002
7	7,5		6,00		0,001
8	7,5		5,87		0,002

Tabela 7 – Eficiência da descoloração do efluente industrial através da quitosanaisolada de *Absidia corymbifera*

Ensaio	Quitosana (g/L)	Agitação (rpm)	Descoloração(%)
1	5	0	100
2	10	0	100
3	5	150	98,07
4	10	150	98,07
5	7,5	75	96,15
6	7,5	75	98,07
7	7,5	75	99,03
8	7,5	75	98,07

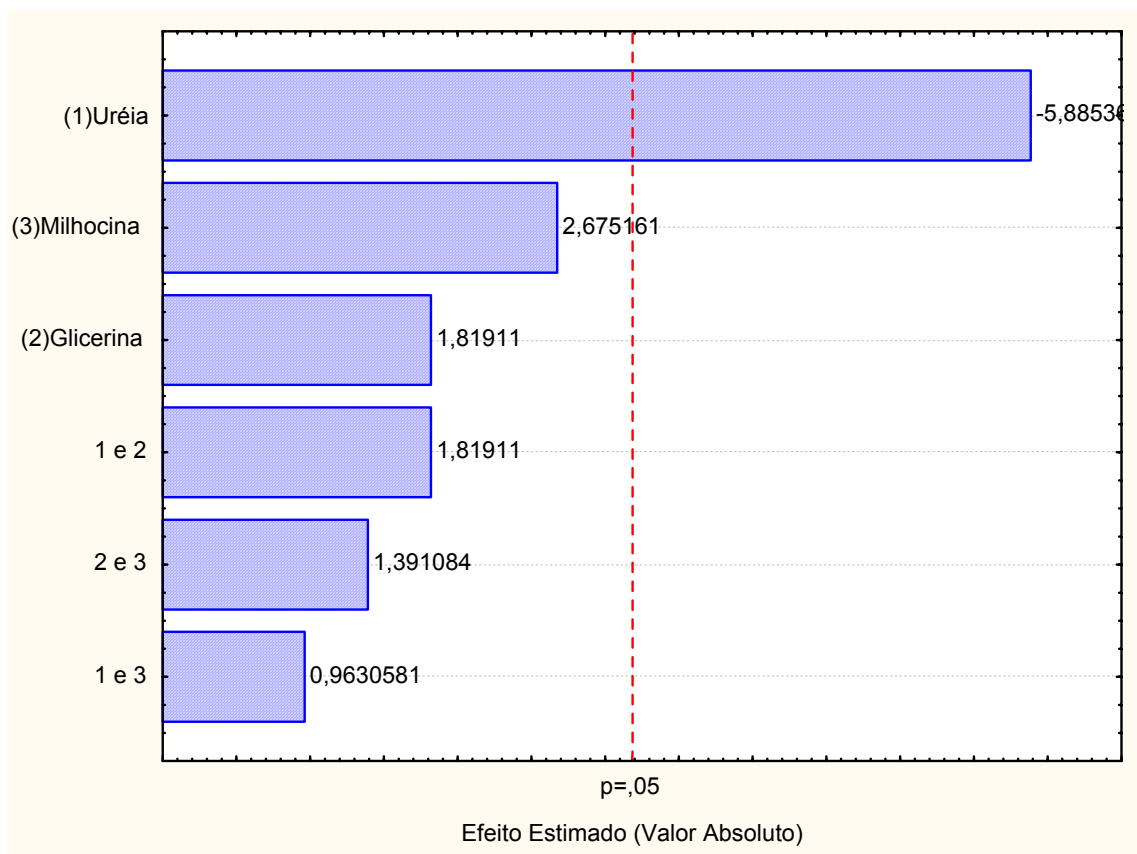


Figura 1 – Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) uréia, (2) glicerina e (3) milhocina e como variável resposta produção da biomassa por *Absidia corymbifera*:

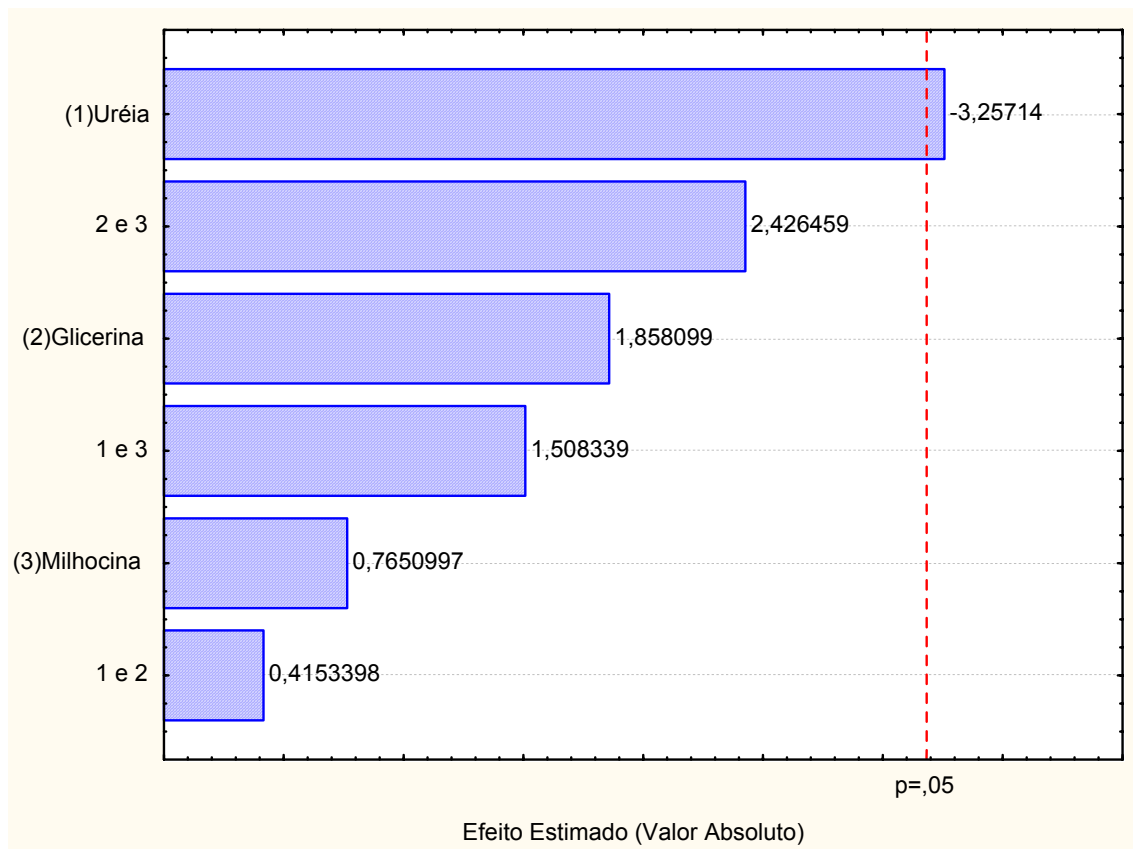


Figura 2 – Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) uréia, (2) glicerina e (3) milhocina e como variável resposta o rendimento de quitosana produzida por *Absidia corymbifera*

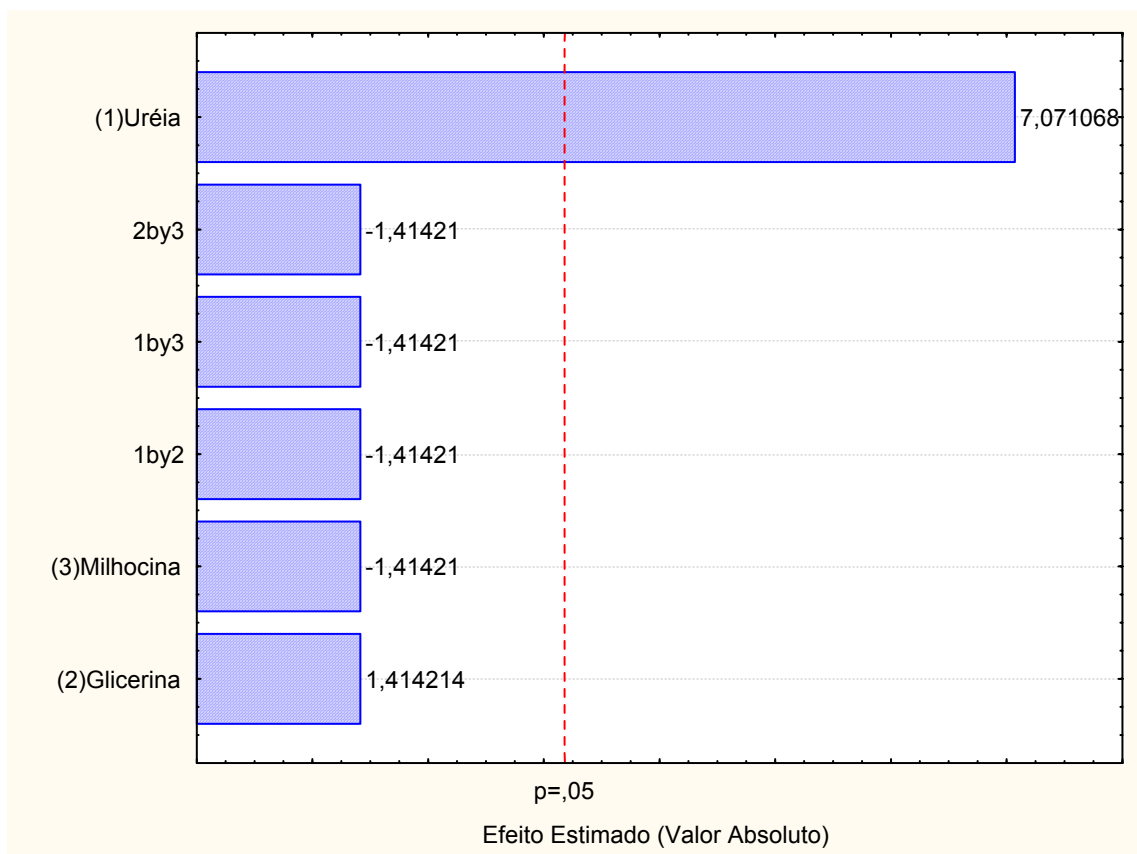


Figura 3 – Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^3 tendo como variáveis independentes as concentrações de (1) uréia, (2) glicerina e (3) milhocina e como variável resposta o pH final do meio de produção

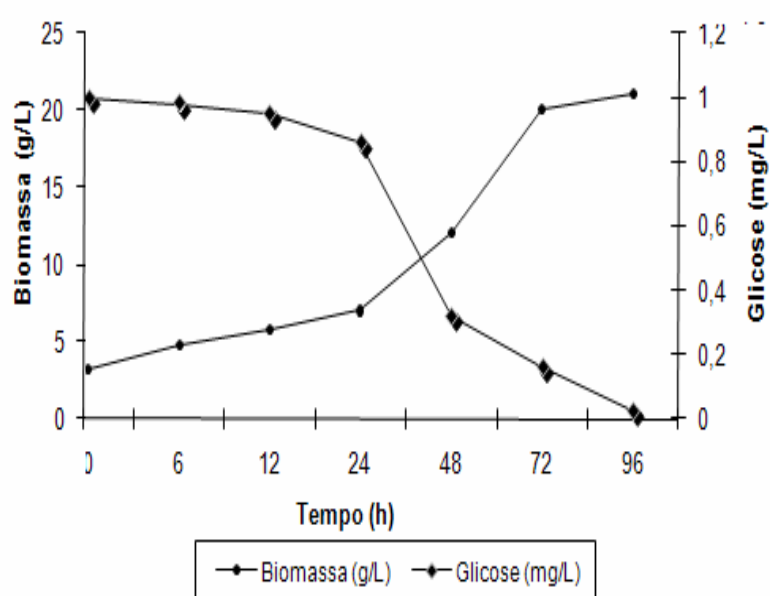


Figura 4 – Perfil de produção de biomassa por *Absidia corymbifera* em meio de cultivo contendo 6% Milhocina, 6% Glicerina e 0,25% Uréia, durante 96 horas de fermentação

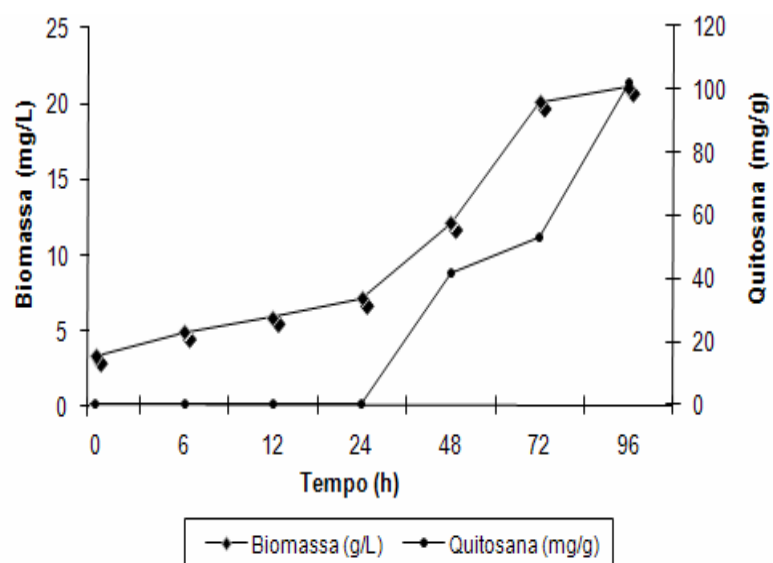


Figura 5 – Perfil de produção de quitosana por *Absidia corymbifera* em meio de cultivo contendo 6% Milhocina, 6% Glicerina e 0,25% Uréia, durante 96 horas de fermentação

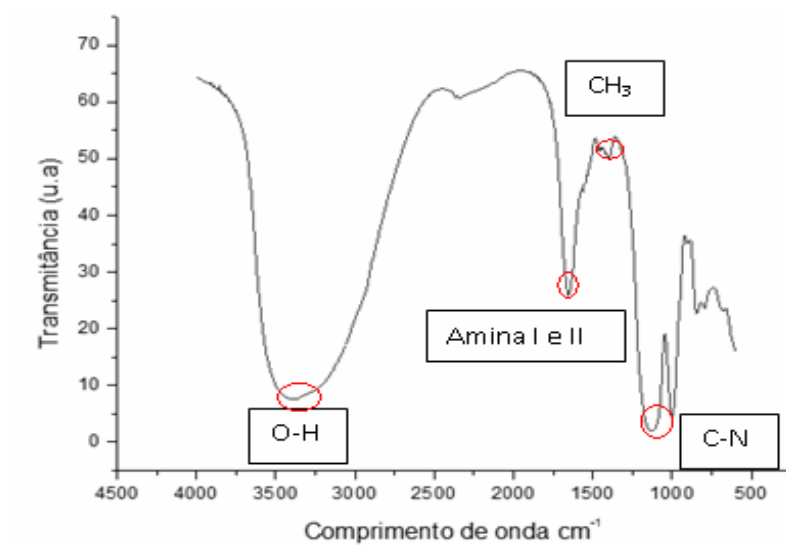


Figura 6- Espectro na região do infravermelho de quitosana da melhor condição de produção (ponto central)

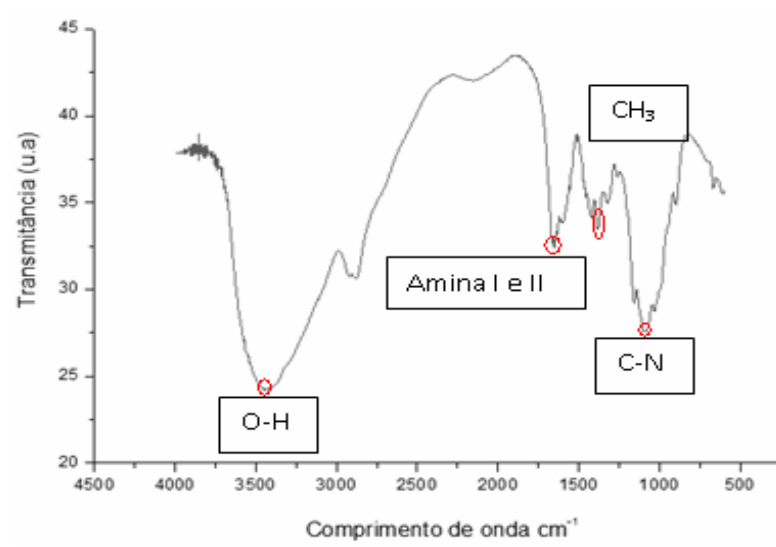


Figura 7- Espectro na região do infravermelho de quitosana comercial (padrão POLYMAR)

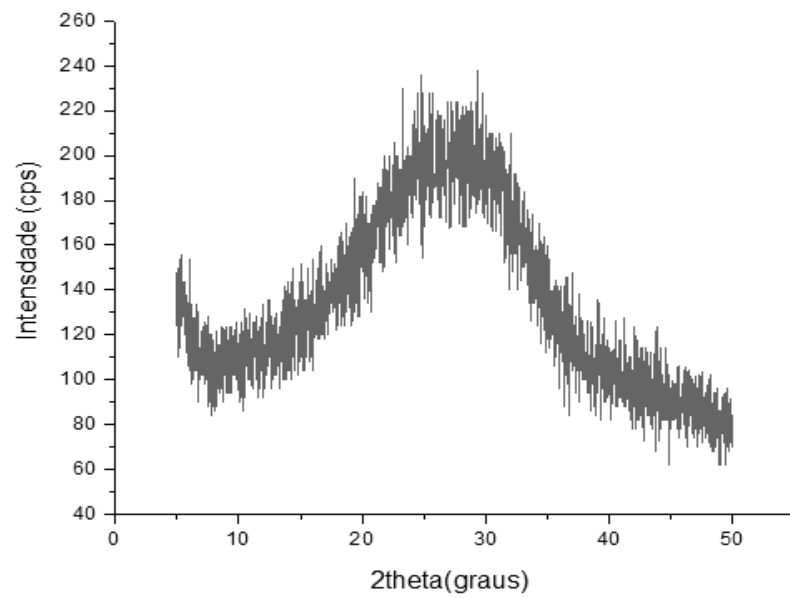


Figura 8- Difratoograma de Raio- x da Quitosana produzida por *Absidia corymbifera* a partir da condição selecionada

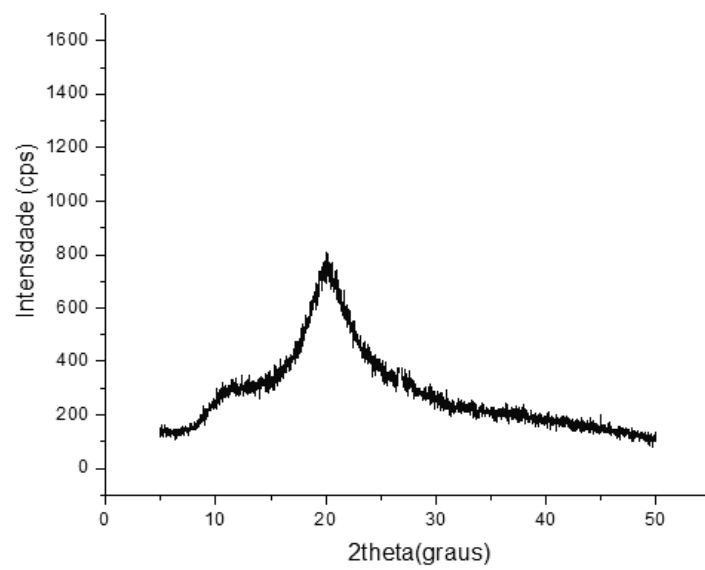


Figura 9- Difratoograma de Raio- x da amostra de Quitosana comercial (padrão POLYMAR)

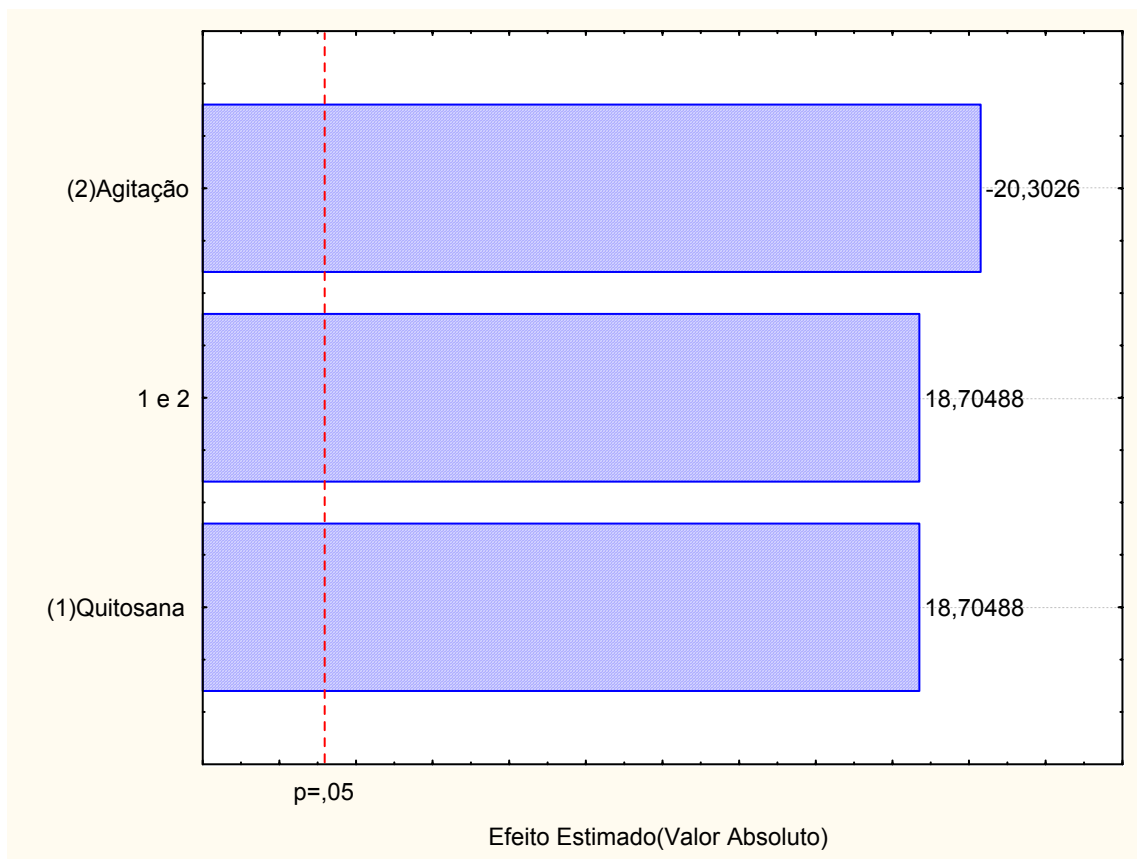


Figura 10 – Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^2 tendo como variáveis independentes (1) a concentração de quitosana isolada de *Absidia corymbifera* (2) agitação e como variável resposta a eficiência da descoloração do efluente industrial

Normas da Revista

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/405854/authorinstructions#Text

Guide for Authors - Contents list:

[Short Overview](#)

Manuscript Preparation:

[General](#)

[Structure](#)

[Text Layout](#)

[Corresponding Author](#)

[Abstract](#)

[Keywords](#)

[Symbols](#)

[Units](#)

[Maths](#)

[References](#)

[Illustrations](#)

[Colour Costs and Queries](#)

[Free Online Colour](#)

[Tables](#)

[Figures](#)

[Conclusions](#)

[Electronic Annexes](#)

[Supplying the Final Accepted Print Version with Disk](#)

Other:

[Notification](#)

[Copyright](#)

[PDF Proofs](#)

[Author Benefits](#)

[Online Paper Tracking](#)

[Enquiries](#)

[Useful Links](#)

Short Overview

When submitting a manuscript to the journal, authors must choose one or more classifications that best describe their manuscript. A list of classifications can be found [here](#)

Submission of papers:

Papers from all over the World: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/>. Authors may choose among Dr. Ashok Pandey, Dr. Christian Larroche and Dr. Steve Ricke

Covering letter to the editor:

When submitting the manuscript, it is mandatory to include a covering letter to the editor. The covering letter must state:

- (1) Subject Classification selected from the list (see guide for authors).
- (2) That all the authors mutually agree that it should be submitted to BITE.

- (3) It is the original work of the authors.
- (4) That the manuscript was not previously submitted to BITE.
- (5) State the novelty in results/ findings, or significance of results.

Submission language: English (Link to the Oxford English Dictionary [⇒http://dictionary.oed.com/entrance.dtl](http://dictionary.oed.com/entrance.dtl))

English language help service: Upon request Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Types of contributions: Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews.
Review articles would be generally solicited by the editors from the experts. However, these can be contributed by others also. In this case, authors must consult the editor with an extended summary and outline before preparing the article.

Corresponding author: Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Original material: Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Editor's requirements: Nucleotide or protein sequences should be deposited in a publicly available database such as Genbank or EMBL before a manuscript is submitted for review in the journal. Accession numbers must be obtained and included in the manuscript before it is fully accepted for publication by the editor.

Detailed instructions on manuscript preparation and artwork instructions can be found below. The editor reserves the right to return manuscripts that do not conform to the instructions for manuscript preparation and artwork instruction, as well as paper that do not fit the scope of the journal, prior to refereeing.

If at the time you submit your manuscript for review to *Bioresource Technology*, you also have other manuscripts in review (with other journals) that are similar to, or are pertinent to your *Bioresource Technology* manuscript, please send a copy of these manuscripts to the relevant handling editor, so that they may be able to conduct a full review on your *Bioresource Technology* manuscript.

[Back to the contents list](#)

Manuscript Preparation:

General:

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity. Please use Word, Word Perfect or LaTeX files for the text of your manuscript. (For further information about LaTeX submission, please go to [⇒http://www.elsevier.com/locate/latex](http://www.elsevier.com/locate/latex).)
[Back to contents list](#)

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

[Back to the contents list](#)

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length: Maximum page length should be 12, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

[Back to the contents list](#)

Corresponding author:

Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

[Back to the contents list](#)

Abstract:

Each paper should be provided with an Abstract of about 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

[Back to the contents list](#)

Keywords:

Immediately after the abstract, provide a maximum of five keywords (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

[Back to the contents list](#)

Symbols:

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), '%' and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Units:

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and must not be used.

[Back to the contents list](#)

Maths:

Authors should make clear any symbols (e.g. Greek characters, vectors, etc.) which may be confused with ordinary letters or characters. Duplicated use of symbols should be avoided where this may be misleading. Symbols should be defined as they arise in the text and

separate Nomenclature should also be supplied.

References:

All publications cited in the text should be presented in a list of references (maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively) following the text of the manuscript.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
 3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.
Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

[Back to the contents list](#)

Colour Costs and Queries:

For colour illustrations, a colour printing fee is charged to the author per colour unit. Further information concerning colour illustrations and costs is available from Author Support at authorsupport@elsevier.ie, and at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>.

[Back to the contents list](#)

FREE ONLINE COLOUR

If, together with your accepted article, you submit usable colour and black/white figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. 'Usable' means the formats comply with our instructions. See the information about Illustrations at

<http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>. For colour illustrations in the print journal see Colour Costs above.

[Back to the contents list](#)

Tables:

Tables should be numbered consecutively and given suitable captions and each table should begin on a new page. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (for example, in graphs). Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is

6.

[Back to the contents list](#)

Figures:

Please make sure that figure files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6.

[Back to the contents list](#)

Conclusions:

State here the inferences drawn from the results, preferably in running text form, in maximum 100 words. No results should be given here.

[Back to the contents list](#)

Electronic Annexes

We strongly encourage you to submit electronic annexes, such as short videos, computer-enhanced images, audio clips and large databases. Please refer to the Artwork Instructions (Multimedia files) at ☞ <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork> for details on file types to be used. If you are submitting on hardcopy, please supply 3 disks/CD ROMs containing the electronic annex to the editor for review. In the text of your article you may wish to refer to the annex. This is not mandatory, however, if you do wish to refer to the annex in the text then please do so using this example: "?see Electronic Annex 1 in the online version of this article." Production will insert the relevant URL at the typesetting stage after this statement.

[Back to the contents list](#)

Notification:

Authors will be notified of the acceptance of their paper by the editor. The Publisher will also send a notification of receipt of the paper in production.

[Back to the contents list](#)

Copyright:

All authors must sign the Transfer of Copyright agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the authors' proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

For more information please go to our copyright page ☞ <http://www.elsevier.com/copyright>

[Back to the contents list](#)

PDF Proofs:

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. The corrections should be returned within 48 hours. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be

allowed at this stage. Proofreading is solely the author's responsibility. Any queries should be answered in full. Please correct factual errors only, or errors introduced by typesetting. For more information on proofreading please go to our proofreading page <http://authors.elsevier.com/quickguide>. Please note that once your paper has been proofed we publish the identical paper online as in print.

[Back to the contents list](#)

Author Benefits:

No page charges: Publication in this journal is free of charge.

Free offprints: The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author discount: Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books. See <http://www.elsevier.com/homepage/booksbutler> for more information.

[Back to the contents list](#)

Online Paper Tracking:

Authors can track the status of their accepted paper online at <http://authors.elsevier.com> using the reference supplied by the Publisher.

[Back to the contents list](#)

Capítulo IV

Conclusões Gerais

Os estudos realizados permitiram concluir:

Primeiro Artigo

Quitosana comercial, em forma de flocos e em microesferas (processada biotecnologicamente), apresenta alto poder de adsorção para o tratamento na descoloração de efluente industrial. Ressaltando que no processo de adsorção, a quitosana em microesferas apresenta maior estabilidade que a quitosana em forma de flocos.

Segundo Artigo

A. corymbifera é capaz de produzir quitosana quando cultivada em meio de baixo custo, utilizando como substrato glicerina (resíduo industrial do excedente da produção do biodiesel), associada à milhocina (resíduo do beneficiamento o refino do milho) e uréia;

A quitosana produzida por *A. corymbifera* apresenta um alto grau de deacetilação e baixo índice de cristalinidade;

Quitosana de *A. corymbifera* apresenta excelente potencial para a remoção de poluentes em efluentes industriais, comprovado em testes de descoloração, obtido através processo de adsorção e pela diferença da densidade óptica do efluente industrial. A quitosana possui ainda capacidade de remover sólidos suspensos totais e a demanda química de oxigênio do efluente industrial de refrigerantes e sucos.

ANEXOS