

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

TECIA VIEIRA CARVALHO

**BIOMATERIAIS À BASE DE QUITOSANA DE
CAMARÃO E BACTÉRIAS PARA REMOÇÃO DE
METAIS TRAÇOS E PETRÓLEO**

**FORTALEZA - CE
2006**

TECIA VIEIRA CARVALHO

**BIOMATERIAIS À BASE DE QUITOSANA DE
CAMARÃO E BACTÉRIAS PARA REMOÇÃO DE
METAIS TRAÇOS E PETRÓLEO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

FORTALEZA

2006

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton R. Tabosa CRB-3/888

C329b Carvalho, Tecia Vieira

Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para
remoção de metais traços e petróleo / Tecia Vieira Carvalho
98 f. il. color. enc.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,
2006.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Área de concentração: Microbiologia do Petróleo

1. Quitosana 2. Staphylococcus saprophyticus 3. Biorremediação 4.
Imobilização de microorganismos I. Melo, Vânia Maria Maciel
II. Universidade Federal do Ceará – Pós-graduação em Ciências
Marinhas Tropicais III. Título

CDD 576

CDU 622.323:623.459.8:546.3.9

TECIA VIEIRA CARVALHO

**BIOMATERIAIS À BASE DE QUITOSANA DE CAMARÃO E BACTÉRIAS PARA
REMOÇÃO DE METAIS TRAÇOS E PETRÓLEO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós
Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto
de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Afrânio Aragão Craveiro

PADETEC - Parque de Desenvolvimento Tecnológico

Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz

Universidade Federal da Bahia -UFBA

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse *o dom de* profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

I Coríntios 13 : 1-2

A Deus e a Nossa Senhora de Fátima, aonde busco forças para vencer os desafios da vida.

Aos meus pais Antônio da Silva Carvalho e Maria das Graças Vieira Carvalho (in memoriam), por tudo.

Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhados e amigos, pela ajuda e incentivo.

Ao Ronaldo e a Maria Teciã, pelo amor, carinho e principalmente pela paciência.

Em especial a Lucilene, que tornou possível esse sonho, cuidando do meu bem mais precioso, minha filha.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo**, pela eficiente orientação e por todo conhecimento transmitido e principalmente por confiar no meu potencial;

Ao **Prof. Dr. Afrânio Aragão Craveiro**, pela amizade, oportunidades, compreensão, contribuição para a realização deste trabalho e também por nunca medir esforços para me ajudar, o senhor tem uma participação muito importante em muitas etapas e conquista até esse momento da minha vida;

Ao **Prof. Ary Marques da Silva**, pela amizade e pelas valiosas sugestões na correção deste trabalho;

Ao Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará na pessoa do **Prof. Dr. Francisco Erivan de Abreu Melo**, um grande incentivador dessa conquista, e seus colaboradores pela valiosa ajuda nos ensaios mecânicos;

Ao Laboratório de Análises de Traços do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará, na pessoa do **Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento** e colaboradores, pelas análises de metais traços;

À Empresa **Polymer Ciência e Nutrição S/A**, pelo o fornecimento de matéria-prima.

Aos meus amigos e colegas que sempre acreditaram em mim;

A todos os que fazem o **PADETEC**: Professores, pesquisadores, bolsistas, funcionários, colaboradores e alguns empresários, que não se furtaram a prestar significativa ajuda;

Aos professores e alunos do **LAMI** (Laboratório de Microbiologia e Imunologia) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração;

Aos que fazem a Pós-Graduação do **LABOMAR** (Instituto de Ciências do Mar): Professores, pesquisadores, mestrandos, bolsistas, funcionários e colaboradores, que de alguma forma contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho;

Aos que pouco me admiram e jamais torceram pelo meu sucesso, mas que agindo dessa maneira contribuíram para a superação de muitos obstáculos;

Ao **PADETEC** (Parque de Desenvolvimento Tecnológico), **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), **FINEP** (Financiadora de Estudos e Projetos) e **PETROBRÁS** (Petróleo Brasileiro S.A), pela ajuda financeira;

À **FUNCAP** (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) do Estado do Ceará, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Petróleo	6
3.2. Metais traços	7
3.2.1. Efeitos tóxicos de alguns metais traços	8
3.2.2. Remoção de metais	10
3.3. Biorremediação	12
3.4. Biossurfactantes	13
3.5. Biorremediação com células imobilizadas	14
3.6. Imobilização de células e enzimas	15
3.7. Suportes para imobilização	18
3.8. Fontes de quitina e quitosana na natureza	21
3.9. Imobilização de células em quitosana	24
3.10. Remoção de metais por quitosana	26
3.10.1. Teoria da adsorção	27
3.10.2. Isoterma de adsorção	28
3.10.3. Isoterma de Langmuir	29
3.10.4. Isoterma de Freundlich	30
3.11. Adsorção em batelada	30
3.12. Adsorção em leito fixo (coluna)	30
3.13. Propriedades físicas de materiais	31

4. MATERIAIS E MÉTODOS -----	32
4.1. Obtenção de quitina a partir de carapaças de camarão-----	33
4.2. Obtenção de quitosana -----	33
4.3. Caracterização de quitosana -----	34
4.3.1. Identificação por infravermelho -----	34
4.3.2. Perda por dessecação -----	34
4.3.3. Determinação do pH -----	35
4.3.4. Resíduo de ignição -----	35
4.3.5. Grau de desacetilação da quitosana -----	35
4.3.6. Teor de material insolúvel -----	36
4.3.7. Viscosidade -----	36
4.3.8. Determinação do peso molecular médio por viscosimetria -----	36
4.4. Preparação de esferas de quitosana -----	37
4.5. Identificação genética da cepa PFA 001 e produção de biomassa -----	38
4.6. Imobilização da cepa pfa001 em esferas de quitosana -----	39
4.7. Medida da atividade emulsificante-----	39
4.8. Produção de filmes e membranas de quitosana -----	39
4.9. Teste de solubilidade dos filmes e membranas em pH6 -----	40
4.10. Propriedades mecânicas de filmes e membranas de quitosana -----	40
4.11. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) -----	40
4.12. Estudo da adsorção de íons Cu (II) e Pb (II) com filmes e membranas de quitosana com e sem bactérias imobilizadas -----	41
4.13. Remoção de Cu (II) e Pb (II) de amostras de águas contaminadas por esferas de quitosana com e sem bactérias imobilizadas -----	41
4.14. Estudo da adsorção de Cu (II) e Pb (II) em batelada -----	42
4.15. Estudo da adsorção de Cu (II) e Pb (II) em leito fixo -----	43
4.16. Preparação de hidrogéis de quitosana com e sem a bactéria PFA001 imobilizada-----	44
5. RESULTADOS -----	45
5.1. Obtenção de quitina a partir de carapaças de camarão-----	46
5.2. Obtenção de quitosana -----	47
5.3. Identificação genética da cepa PFA 001 e produção de biomassa -----	48

5.4. Imobilização da cepa PFA001 em esferas de quitosana-----	50
5.5. Medida da atividade emulsificante -----	53
5.6. Produção de filmes e membranas de quitosana-----	53
5.7. Teste de solubilidade dos filmes e membranas em pH 6 -----	57
5.8. Propriedades mecânicas de filmes e membranas de quitosana -----	57
5.9. Estudo da adsorção de íons Cu (II) e Pb (II) com filmes e membranas de quitosana com e sem bactérias imobilizadas -----	58
5.10. Remoção de Cu (II) e Pb (II) de amostras de águas contaminadas por esferas de quitosana com e sem bactérias imobilizadas -----	61
5.11. Estudo da adsorção de Cu (II) e Pb (II) em leito fixo -----	62
5.11.1. Eficiência de dessorção-----	63
5.12. Estudo da adsorção de Cu (II) e Pb (II) em batelada -----	63
5.12.1. Isoterma de adsorção em batelada -----	63
5.13. Preparação de hidrogéis de quitosana com e sem a bactéria PFA001 imobilizada -----	68
6. DISCUSSÃO -----	70
6.1. Obtenção e caracterização de quitina e quitosana-----	71
6.2. Identificação genética da cepa PFA 001 e imobilização em quitosana -----	73
6.3. Tipos de aplicações de esferas de quitosana-----	75
6.4. Efeito do pH na adsorção de Cu (II) e Pb(II)-----	76
6.5. Estudo da adsorção de Cu (II) e Pb (II) em leito fixo -----	77
6.5.1. Eficiência de dessorção -----	78
6.6. Estudo da adsorção de Cu (II) e Pb (II) em batelada -----	78
6.7. Produção de filmes e membranas de quitosana -----	81
6.8. Adsorção de íons Cu (II) e Pb (II) com filmes e membranas-----	82
6.9. Simulação de remoção de petróleo por hidrogéis de quitosana com e sem a bactéria PFA001 imobilizada-----	83
7. CONCLUSÃO -----	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais métodos de imobilização-----	17
Figura 2: Estrutura química dos polissacarídeos: Quitina (a) e Quitosana (b)-----	19
Figura 3: (a)Atração eletrostática; (b) Entrelaçamento -----	23
Figura 4: Estruturas propostas para complexos de Cu (II) com quitosana: (a) Modelo do Pendente; (b) Modelo da Ponte-----	27
Figura 5: Estruturas propostas para complexos de Cu com quitosana com a participação da hidroxila C3-----	28
Figura 6 A: Resistência à tração-----	31
Figura 6 B: Alongamento-----	31
Figura 6 C: Diagramas tensão x deformação-----	31
Figura 6 D: Curvas típicas de tensão x deformação-----	31
Figura 7: Sistema de produção de esferas de quitosana-----	37
Figura 8: Sistema de remoção dos metais traços Cu(II) e Pb(II) em coluna de esferas de quitosana-----	43
Figura 9: Seqüência do experimento de simulação de remoção de petróleo da água-----	45
Figura 10: Espectro de absorção da quitina no Infravermelho-----	46
Figura 11: Espectro de absorção da quitosana no Infravermelho-----	48
Figura 12: Alinhamento entre as seqüências do rDNA 16S da linhagem PFA001 (1) e de <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305. Essa última seqüência foi obtida do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Nucleotídeos conservados nas duas seqüências estão indicados por barras verticais-----	50
Figura 13. Medida da esfera de quitosana em mm-----	51
Figura 14: Esferas de quitosana (A) e esferas de quitosana contendo células da bactéria <i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> PFA001 imobilizadas na proporção 1:1 (m/m) de quitosana:biomassa (B)-----	51
Figura 15: MEV de um flocos de quitosana-----	52
Figura 16: MEV de uma esfera de quitosana com a bactéria	

<i>Staphylococcus saprophyticus</i> immobilizada-----	52
Figura 17: Aspecto da emulsificação de uma mistura querosene-água promovida por esferas de quitosana com a bactéria	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> immobilizada-----	53
Figura 18: Membrana quitosana-----	55
Figura 19: Aspecto superficial de membrana (A) e filme (B) de quitosana como revelado por microscopia eletrônica de varredura-----	54
Figura 20: Aspectos de membranas de quitosana contendo células de <i>S. saprophyticus</i> immobilizadas como revelado por microscopia eletrônica de varredura-----	55
Figura 21: Espectro de absorção infravermelha de membrana de quitosana-----	56
Figura 22: Espectro de absorção infravermelha de membrana de quitosana com células de <i>S. saprophyticus</i> immobilizadas-----	56
Figura 23: Aspecto do rompimento da membrana de quitosana com <i>S. saprophyticus</i> immobilizada-----	58
Figura 24: Sistema de cartuchos com os filmes e membranas de quitosana para adsorção dos íons metálicos Cu (II) e Pb (II)-----	60
Figura 25: Aspectos dos filmes de quitosana antes e após adsorção dos íons Cu (II)-----	61
Figura 26: Remoção dos metais traços Cu(II) e Pb(II) de esferas de quitosana em batelada-----	64
Figura 27 Adsorção experimental de Cu (II) em esferas de quitosana-----	65
Figura 28: Adsorção experimental de Cu (II) em esferas de quitosana contendo células de <i>S. saprophyticus</i> immobilizadas-----	65
Figura 29: Adsorção experimental de Pb (II) em esferas de quitosana-----	66
Figura 30: Adsorção experimental de Pb (II) em esferas de quitosana contendo células de <i>S. saprophyticus</i> immobilizadas-----	66
Figura 31: Aspecto do espalhamento de petróleo em uma amostra de água do mar e água destilada-----	68
Figura 32: Aspecto de uma amostra de petróleo antes (A) e após adição de solução de quitosana (B)-----	69
Figura 33. Mecanismo de adsorção do íon metálico no polímero quelante-----	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e limitações do uso de microrganismos encapsulados para aplicações em solo-----	15
Tabela 2: Áreas de emprego de quitina e quitosana-----	20
Tabela 3: Características físico - químicas da quitosana-----	47
Tabela 4: Propriedades físicas de membranas e filmes de quitosana sem e com bactérias imobilizadas-----	57
Tabela 5: Tempo de escoamento da solução de Cu (II) em membranas e filmes de quitosana-----	59
Tabela 6: Tempo de escoamento da solução de Pb (II) em membranas e filmes de quitosana-----	60
Tabela 7: Capacidade de adsorção de Cu (II) e Pb (II) em membranas e filmes de quitosana-----	60
Tabela 8: Percentagem de remoção de Cu(II) de amostras de água por esferas de quitosana com e sem a bactéria PFA001 imobilizada-----	61
Tabela 9: Percentagem de remoção de Pb (II) de amostras de água por esferas de quitosana com e sem a bactéria PFA001 imobilizada-----	63
Tabela 10: Capacidade de adsorção de Cu (II) e Pb (II) por esferas de quitosana com e sem bactéria imobilizada-----	63
Tabela 11: Eficiência da remoção (dessorção) de Cu (II) e Pb (II) das esferas de quitosana com e sem a bactéria <i>S. saprophyticus</i> imobilizada-----	64
Tabela 12: Parâmetros de ajuste dos resultados em sistema de batelada das isothermas realizadas com QT e coeficientes de correlação (r)-----	68
Tabela 13: Parâmetros de ajuste dos resultados em sistema de batelada das isothermas realizadas com QTB e coeficientes de correlação (r)-----	68
Tabela 14: Percentuais de remoção de petróleo de amostras de água do mar e água destilada por hidrogéis de quitosana sem e com células de <i>S. saprophyticus</i> imobilizadas-----	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas.

ASTM - Standard Test Methods.

Ce - Concentração no equilíbrio ou concentração final do metal na solução.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente.

Da – Daltons.

E24 - Percentual de emulsificação com 24 horas.

ETDA - Ácido etileno di-amino tetra acético.

g – Grama.

GD - Grau de desacetilação.

HCl – Ácido Clorídrico.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente.

IV – Infravermelho Vermelho.

LAMI - Laboratório de Microbiologia e Imunologia.

LUBNOR – Lubrificantes do Nordeste S.A.

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura.

NaOCl – Hipoclorídrico de sódio.

NaOH – Hidróxido de sódio.

NBR - Norma Brasileira.

PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico.

pH – Potencial Hidrogeniônico.

pKa – Potencial da constante de dissociação do ácido

Q - Quantidade do metal adsorvido em $\mu\text{g/g}$ -grama de adsorvente.

Q_{max} - Capacidade máxima de adsorção.

QT – Quitosana.

QTB - *S. saprophyticus* imobilizados em quitosana.

rDNA – DNA ribossomal.

UFBA – Universidade Federal da Bahia.

UFC - Universidade Federal do Ceará.

USP - United States Pharmacopeia.

UV – Radiação Ultravioleta.

RESUMO

Ao mesmo tempo em que se avolumam os problemas ambientais causados pelos impactos de atividades industriais o homem tenta aperfeiçoar ou desenvolver novas técnicas de descontaminação. A biorremediação se destaca pela ampla gama de microrganismos que podem metabolizar muitos dos principais poluentes, além de não deixar resíduos ou subprodutos recalcitrantes, como geralmente ocorre com outras técnicas. Uma das mais recentes inovações nesta área diz respeito ao uso de microrganismos imobilizados. A imobilização traz uma série de vantagens, além de facilitar o controle do processo e dos microrganismos. A quitosana, um polissacarídeo natural que pode ser obtido de carapaças de crustáceos, agrega várias características que o tornam um suporte ideal para imobilização de certos organismos. Destaca-se sua biodegradabilidade, lipofilicidade, capacidade de formar gel e microesferas, além de poder ser reticulado. Neste trabalho foi preparada uma quitosana a partir de quitina de carapaças de camarão com grau de desacetilação de 78% e massa molar média de 117.000 Da. Esse polímero serviu de matriz para imobilização de uma cepa da bactéria *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, selecionada pela hidrofobicidade de sua parede celular, o que a torna um emulsificante. Foram produzidos esferas, membranas, filmes e hidrogéis de quitosana sem e com a bactéria imobilizada. Os produtos foram testados quanto à capacidade de emulsificação de misturas óleo-água, remoção de cobre e chumbo de amostras de águas contaminadas e como coagulantes de óleo em água. Os produtos também foram avaliados quanto à resistência mecânica, uniformidade, solubilidade, além de serem analisados por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que a incorporação da bactéria a quitosana melhorou significativamente a resistência desse polímero. A membrana de quitosana suportou até 53,62 Mpa enquanto uma membrana semelhante contendo bactérias imobilizadas suportou até 73,96 Mpa. As esferas com a bactéria também se destacaram pela uniformidade e resistência a agitação mecânica durante os testes de emulsificação de misturas óleo-água. As esferas com células ao contrário das esferas sem células promoveram a emulsificação de hidrocarbonetos, atingindo um percentual de 60% de emulsificação. Os filmes obtidos pelo tratamento das membranas com glicerol 20% se comportaram bem diferentes das membranas. Os filmes foram menos resistentes a tração, suportando 20,50 Mpa e 8,91 Mpa, para filmes sem células e com células respectivamente. Por outro lado, foram significativamente mais elásticos do que as

membranas, como provado pelos valores dos módulos de Young, 146,4 Mpa e 222,8 Mpa, para filmes sem células e com células, respectivamente. As membranas com bactérias imobilizadas removeram mais eficientemente cobre e chumbo do que as membranas sem células, enquanto os filmes independentemente de terem ou não células imobilizadas foram impermeáveis à passagem dessas soluções. As esferas de quitosana contendo células foram significativamente mais eficientes para adsorver cobre e chumbo de amostras de águas contaminadas. Comparativamente, o cobre foi melhor adsorvido do que o chumbo nas esferas. Não foram observadas diferenças na remoção de até 200 µg/g de cobre e chumbo atribuíveis às diferenças da água doce e água do mar. A adsorção de cobre e chumbo foi da ordem de 20 mg/g de quitosana enquanto a capacidade de dessorção foi de mais de 90% para o cobre e mais de 80% para o chumbo. Não foram observadas diferenças entre a coagulação de amostras de petróleo derramadas em água com géis de quitosana sem células ou com células. Conclusivamente, os produtos desenvolvidos e testados neste trabalho possuem grande potencial para emprego em atividades de biorremediação.

Palavras-chave: Quitosana, imobilização, *Staphylococcus saprophyticus*, biorremediação, petróleo, metais traços.

ABSTRACT

As the environmental problems caused by the impacts of industrial activities increase the man tries to improve or to develop new descontamination techniques. The bioremediation stands out for a wide range of microorganisms that can metabolize many of the pollutants, besides not leaving residues or recalcitrant by-products, as it usually happens with other techniques. One of the most recent innovations in this concern is the use of immobilized microorganisms. The immobilization has many advantages besides facilitating the control of the process and the microorganisms. The chitosan, a natural polysaccharide that can be obtained from crustacea shells, presents several characteristics that turn it an ideal support for immobilization of certain microorganisms such as its biodegradability, lipofilic properties, capacity to form gel and beads and it can be reticulated. In this work was prepared a chitosan starting from chitin of shrimp shells with degree of desacetylation of 78% and molar mass of 117.000 Da. This polymer was used for immobilization of the *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* strain, selected by the cell-wall hydrophobicity, what turns it an emulsificant. Beads, membranes, films and hydrogels were produced with and without immobilized bacteria. The products were tested for oil-water emulsification, removal of copper and lead from contaminated water and as clotting of oil in water. The products were also available for the mechanical resistance, uniformity, solubility and analyzed by electronic microscopy of varredure. The results showed that the incorporation of the bacteria into chitosan improved significantly the resistance of this polymer. The chitosan membrane supported up to 53.62 Mpa while a similar membrane containing immobilized bacteria supported up to 73.96 Mpa. The beads with the bacterium also stood out for the uniformity and mechanical resistance during the tests of oil-water emulsification. The beads with cells unlike the beads without cells promoted the hydrocarbon emulsification, reaching of 60%. The films obtained by the treatment of the membranes with glycerol 20% behaved very different far from the membranes. The films were less resistant to traction, supporting 20.50 Mpa and 8.91 Mpa, for films without cells and with cells respectively. On the other hand, the films were significantly more elastic than the membranes, as proven by the values of the Young modules, 146.4 Mpa and 222.8 Mpa, for films without cells and with cells, respectively. The membranes with immobilized bacteria removed copper and lead more

efficiently than the membranes without cells, while the films showed the same result independently of having or not immobilized cells. Both films were impermeable to the passage of copper and lead solutions. The beads containing cells were significantly more efficient for metal adsorption from samples of polluted waters. Comparatively, the copper was better adsorbed than the lead. There were not observed any difference on the removal of 200 µg/g of copper and lead that should be attributed to the differences of fresh and sea water. The copper and lead adsorption was of 20mg/g of chitosan while the desorption was more than 90% for the copper and more than 80% for the lead. No differences were observed among the petroleum coagulation spilled in water with chitosan gels with or without cells. In conclusion, the products developed and tested in this work showed great potential for bioremediation applications.

Words-key: chitosan, immobilization, *Staphylococcus saprophyticus*, bioremediation, petroleum, metals.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados impulsionam a economia mundial, através da produção de energia e da sua utilização na indústria petroquímica. Contudo as atividades de extração, refinamento, estocagem e transporte representam um grande risco ambiental devido à ocorrência de vazamentos rotineiros, derramamentos acidentais ou intencionais (SHIRAKAWA et al., 2001). Os poluentes derivados dessas ações juntamente com os metais traços estão entre os graves problemas ambientais enfrentados pela humanidade neste novo século.

Ao mesmo tempo em que se avolumam os problemas ambientais os cientistas tentam aperfeiçoar ou desenvolver novas técnicas de despoluição. A biorremediação vem despontando como uma tecnologia atraente que pode auxiliar na resolução desses problemas, já que tem a vantagem de levar a completa mineralização dos poluentes não deixando resíduos ou subprodutos recalcitrantes, como geralmente ocorre com outras técnicas.

A biorremediação pode ser feita com microrganismos livres, imobilizados ou apenas com os produtos desses microrganismos. Dentro da linha da ecologia contemporânea, onde se buscam tecnologias limpas, menos agressivas ao ambiente, é que a pesquisa tem se voltado para a busca de polímeros naturais para imobilização de células ou enzimas. Neste contexto, a quitina desponta como uma matéria prima de grande potencial para o desenvolvimento de matrizes para imobilização. A quitina é um polissacarídeo encontrado naturalmente na carapaça de crustáceos, no exoesqueleto dos insetos e na parede celular de alguns fungos (CHATTERJEE et al., 2005). É considerado o biopolímero mais abundante na natureza depois da celulose e a sua desacetilação, quer por tratamento com bases fortes, quer por métodos microbiológicos origina a quitosana (CHATTERJEE et al., 2005), um polímero com características aplicáveis em vários setores de atividades. Dentre as diversas aplicações da quitosana destacam-se seu uso na área médica, como veículo para a liberação controlada de drogas, como curativos e como agente antimicrobiano. Na área ambiental a quitosana tem sido explorada para remoção de metais traços de água e efluentes industriais. Na indústria de alimentos a quitosana pode ser usada como espessante, preservante e ainda como embalagem, dentre outras aplicações (RORRER; HSIEN; WAY, 1993; RIBEIRO et al., 1999).

Diante do exposto, este trabalho se propôs a explorar a quitosana de camarão como suporte para imobilização de bactérias visando o desenvolvimento de produtos aplicáveis a biorremediação de áreas contaminadas com petróleo ou com seus derivados incluindo metais traços.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de produtos à base de quitosana de camarão contendo bactérias imobilizadas para fins de biorremediação de ambientes contaminados com petróleo e metais traços.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Obtenção e caracterização de quitosana de camarão.

2.2.2. Produção de esferas, membrana, filmes e hidrogel de quitosana com e sem bactérias imobilizadas.

2.2.3. Caracterização físico-química e estrutural dos produtos desenvolvidos.

2.2.4. Verificação da eficiência dos produtos em atividades simuladas de biorremediação.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PETRÓLEO

É inquestionável a importância do petróleo e dos seus derivados em vários setores da economia. As atividades da indústria petrolífera, entretanto, envolvem vários riscos ao ambiente. Os derramamentos de óleo nos oceanos e em grandes extensões de praias têm sido apontados como grandes desastres ecológicos. A indústria do refino de petróleo também é responsável pela poluição em áreas urbanas, através da liberação no ambiente de substâncias recalcitrantes ou persistentes. Desta forma os poluentes contaminam o ambiente e podem interferir no funcionamento normal da biosfera (LYNCH; HOBBIE, 1988; ATLAS; BARTHA, 1992).

O petróleo é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e de cor variando entre o negro e o castanho escuro. Embora objeto de muitas discussões no passado, atualmente se tem como certa a sua origem orgânica. Admite-se que esta origem esteja ligada à decomposição do plâncton que foi, ao longo de milhões de anos, se acumulando no fundo dos mares e dos lagos, sendo pressionado pelos movimentos da crosta terrestre e se transformou no petróleo. Ao contrário do que se pensa, o petróleo não permanece na rocha em que foi gerado - a rocha matriz - mas desloca-se até encontrar um terreno apropriado para se concentrar (THOMAS, 2001). O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e de pequenas quantidades de compostos orgânicos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio, assim como baixas concentrações de compostos organometálicos principalmente níquel e vanádio (VAN HAMME et al., 2003).

A composição do petróleo varia em função de sua localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas que o originaram. Grande parte de seus componentes (de 60% a 90%) é passível de biodegradação. Entretanto, o restante (bruto ou refinado) é recalcitrante, isto é, demora a desaparecer por meios naturais. O petróleo e seus produtos são liberados para o meio ambiente através de acidentes durante carga, descarga, transporte ou produção de subprodutos. Essa contaminação causa distúrbios no funcionamento normal dos ecossistemas e pode comprometer a sobrevivência de muitas espécies de animais e vegetais (THOMAS, 2001). Portanto, a compreensão do comportamento de diferentes componentes do petróleo, no solo, na água e no ar é muito importante na avaliação dos efeitos para a biota e para o desenvolvimento de tecnologias de remediação (REID et al., 2000).

3.2. METAIS TRAÇOS

O desenvolvimento industrial ocorreu de forma extremamente acelerada a partir da revolução industrial, após meados do século XIX. A partir desse período, a poluição ambiental causada pelo homem aumentou consideravelmente e de modo descontrolado, de forma que as relações entre o homem e o seu meio ambiente se modificaram. Atualmente não é possível estimar a enorme quantidade de produtos e substâncias produzidas industrialmente, sendo que os dejetos e emissões das mesmas ao meio ambiente são igualmente diversos.

A poluição industrial ocorre em todos os meios da biosfera, na água doce, nos oceanos, na atmosfera e no solo. Conseqüentemente as comunidades biológicas dos ecossistemas estão em contato com substâncias e materiais não naturais, a maioria dos quais causando algum tipo de dano ecológico. A poluição industrial afeta diretamente o homem, que pode contaminar-se através da água, ar e alimentos (LARISON et al., 2000).

Entres os poluentes mais prejudiciais ao ecossistema estão os metais traços. Estes elementos existem naturalmente no ambiente e são necessários em concentrações mínimas na manutenção da saúde dos seres vivos (são denominados oligoelementos ou micronutrientes). Alguns metais essenciais aos organismos são o ferro, cobre, zinco, cobalto, manganês, cromo, molibdênio, vanádio, selênio, níquel e estanho, os quais participam do metabolismo e formação de muitas proteínas, enzimas, vitaminas, pigmentos respiratórios (como o ferro da hemoglobina humana ou o vanádio do sangue das ascídias). No entanto, quando ocorre o aumento destas concentrações, normalmente acima de dez vezes, efeitos deletérios começam a surgir (CHAGAS, 1999).

A crescente quantidade de indústrias atualmente em operação, especialmente nos grandes pólos industriais do mundo, tem causado o acúmulo de grandes concentrações de metais nos corpos hídricos como rios, represas e nos mares costeiros. Isto ocorre, pois grande parte das indústrias não trata adequadamente seus efluentes antes de lançá-los no ambiente. Os metais, quando lançados na água, agregam-se a outros elementos, formando diversos tipos de moléculas, as quais apresentam diferentes efeitos nos organismos devido a variações no grau de absorção pelos mesmos (MOUNTOURIS et al., 2002). O zinco, por exemplo, pode formar $Zn(OH)_2$, $ZnCO_3$, o mercúrio pode constituir $HgCl_2$, Hg_2SO_3 , o chumbo pode constituir $Pb(OH)_2$, $PbCO_3$, e assim por diante. Apesar da toxicidade de cada

metal variar de acordo com a espécie, existe uma classificação da toxicidade relativa dos metais mais comuns no meio ambiente, em ordem decrescente de periculosidade: Hg, Ag, Cu, Zn, Ni, Pb, Cd, As, Cr, Sn, Fe, Mn, Al, Be, Li (WASE; FORSTER, 1997).

3.2.1. Efeitos tóxicos de alguns metais traços

Alguns metais traços são essenciais como oligoelementos para a vida animal e vegetal, entretanto em altas concentrações podem ser nocivos à saúde, tornando-se tóxicos ou danosos. A ciência busca conhecer melhor os mecanismos de ação dos metais sobre o metabolismo humano, assim como seus limites de concentração e efeitos nos casos de intoxicações por doses crônicas (CHAGAS, 1999).

O mercúrio é um metal altamente tóxico e acumulativo nas redes tróficas. Em quase todas as suas formas, pode causar morbidade e mortalidade ao homem, matar inúmeros microrganismos e prejudicar os vegetais, principalmente inibindo a fotossíntese. O homem pode absorver o mercúrio de diversas formas, por várias vias, entretanto, a inalação de vapores e a ingestão de alimentos contaminados são os meios mais comuns de agressões à saúde. Apesar do conhecimento dos riscos que o mercúrio oferece é muito comum à intoxicação por este metal, principalmente nos grupos localizados em indústrias e garimpos (PIRES; MACHADO; BITTAR, 1988).

A prata é um elemento traço de ocorrência natural, que é muito empregado em indústrias de fotografia e imagem, bem como em eletro-eletrônicos de um modo geral. Essa acentuada utilização implica na descarga desse metal para o ambiente, o que representa risco para organismos aquáticos e terrestres. Essa preocupação se justifica pelo seu reconhecido potencial tóxico quando despejado sem critérios no ambiente. Vários trabalhos encontrados na literatura abordam os problemas ambientais causados pela Ag em diversos rios no mundo, relatando contaminação de origem antropogênica em sedimentos, água e organismos aquáticos (WARILA et al., 2001).

O cobre pode está presente no solo em teores muito elevado de 200-250 μ g/g, mas geralmente é encontrado nas concentrações de 15 a 40 μ g/g. A variação é devido às rochas de origem. É um elemento essencial para as plantas, mas que pode ser tóxico. É um dos metais menos móvel no perfil do solo (SANEPAR, 1997). A faixa de absorção do cobre pelas plantas varia de 2-30 ppm. O efeito tóxico em relação ao comportamento em sistemas solo – planta

pode variar consideravelmente em função do clima, vegetação cultivada, tipo de solo, etc. O cobre assim como o ferro participa de um número muito grande de processos biológicos. Este elemento quando ingerido, se associa à albumina para se depositar sobre os tecidos do fígado, cérebro, córnea e rins, ocasionando a doença de Wilson, uma enfermidade resultante em alterações do metabolismo do cobre (FÁVERE, 1994.).

O zinco é essencial para o homem e sua deficiência causa severas conseqüências para a saúde. A média diária de ingestão de zinco por um adulto está em torno de 14 mg sendo que a maioria provém dos alimentos. Da quantidade de zinco ingerida apenas cerca de 25% é absorvida por um mecanismo homeostaticamente controlado. Mais de 70 metaloenzimas necessitam de zinco como cofator e a deficiência resulta em um grande espectro de efeitos clínicos que dependem principalmente da idade. A deficiência em crianças, por exemplo, pode ser manifestada por dermatites, perda de cabelo e suscetibilidade a infecções. A toxicidade pelo metal está associada a diarreias e a distúrbios gastrintestinais. Os níveis de zinco atmosférico têm aumentado, principalmente nas regiões industriais. O teor de zinco nos solos está entre 10 a 300 $\mu\text{g/g}$ e o valor médio está em torno de 50 $\mu\text{g/g}$ (KAMOGAWA et al., 1997).

O níquel, apesar de se encontrar em vegetais e legumes, na forma da única enzima contendo níquel, a urease, e de existir em pequenas quantidades no organismo, suas funções biológica e toxicológica são desconhecidas (FÁVERE, 1994). O teor de níquel no solo é muito variável dependendo de fatores como a rocha de origem, dentre outros. Os valores médios mundiais estão entre 20 e 40 $\mu\text{g/g}$.

O chumbo é um elemento considerado fisiologicamente não essencial, com poder de bioacumulação, e pode provocar reações com outros elementos (sinergismo). Quando ingerido em altas concentrações é capaz de provocar lesões no sistema neuromuscular, e problemas na circulação, no cérebro e no tubo digestivo, apresentando sintomas como anorexia, náuseas, paralisia, distúrbios visuais, anemia e convulsões. Os sais de chumbo são extremamente tóxicos ao ser humano, tanto em exposições rápidas ou lentas. O chumbo no solo é tido como um elemento não-essencial. Reage com vários componentes do solo o que diminui sua mobilidade. Compostos de chumbo, como chumbo tetra etila colocados na atmosfera pelos veículos e pelas indústrias podem ser levados para longe e depositados pela chuva. É um dos metais móveis no solo (SANEPAR, 1997). Os principais usos do chumbo

estão relacionados às indústrias extrativa, petrolífera, de baterias, tintas e corantes, cerâmica, cabos, tubulações e munições.

O cádmio não é considerado fisiologicamente essencial ao ser humano, e tem sua excreção de forma muito lenta. O ferro, o cálcio, o selênio e o zinco, são elementos inibidores para o cádmio. Apresenta bioacumulação nos tecidos do corpo, podendo apresentar intoxicação crônica, conhecida como cadmiose. Podendo ocorrer sinergismo com outras substâncias tóxicas. Tem-se atribuído ao cádmio a causa de vários processos patológicos no homem, como tumores nos testículos, disfunção renal, hipertensão, arteriosclerose, aumento da inibição, doenças crônicas de envelhecimento e câncer. A dose letal de cádmio para um adulto de 60 kg, é de 0,35 g. No corpo, o metabolismo ocorre pela absorção gastrointestinal, penetrando na circulação sanguínea e concentrando no plasma, alcançando os glóbulos vermelhos, depois segue para os rins, fígado, pâncreas, e glândulas salivares (tireóide). Em parte o cádmio age bloqueando o grupamento tiol, inibindo a respiração celular e em alguns sistemas enzimáticos de grande importância para o funcionamento do organismo (TEIXEIRA, 1998). Sua concentração média na crosta terrestre é de 0,15µg/g. É pouco móvel no perfil do solo (SANEPAR, 1997).

3.2.2. Remoção de metais

Um dos efeitos mais sérios da contaminação ambiental por metais pesados é a bioacumulação dos poluentes pelos organismos vivos. Animais e plantas podem concentrar os compostos em níveis milhares de vezes maiores que os presentes no ambiente. O acúmulo de metais e outros poluentes industriais pelos organismos pode ter efeito bastante abrangente já que possibilita o transporte dos contaminantes via teia alimentar para diversos níveis tróficos da cadeia alimentar. Este efeito culmina com a ocorrência das maiores taxas de contaminação nos níveis mais altos da teia trófica (consumidores secundários e terciários). A importância da preservação dos recursos hídricos tem levado à necessidade de monitorar e controlar a contaminação destes ambientes. Portanto, suas fontes, transporte e destino precisam ser avaliados (BATLEY, 1999).

A eficiência no processo de remoção de íons metálicos tóxicos é uma área onde, atualmente, cresce o número de tecnologias desenvolvidas. Os mais importantes métodos são: filtração, precipitação, adsorção, eletrodeposição e sistemas de membranas. A filtração e a precipitação são eficientes na remoção de altas concentrações de íons metálicos, mas

ineficientes quando se trata de metais traço (PADILHA et al., 1997; SCHMUHL; KRIEG, 2001). A adsorção é ineficiente na remoção destes metais em soluções bastante concentradas. Um dos processos de adsorção mais conhecidos pela sua eficiência consiste na formação de complexos entre polímeros e metais de transição (SCHMUHL; KRIEG, 2001). A precipitação química é usada principalmente para remoção de metais pesados de resíduos aquosos na forma de hidróxidos, sulfetos e carbonatos. A precipitação é realizada pelo ajuste de pH da solução a um ponto onde os constituintes a serem removidos tenham a menor solubilidade. O precipitado formado é separado da solução aquosa através de um sistema de floculação/coagulação. A precipitação de hidróxidos tem sido eficiente na remoção de arsênio, cádmio, cromo (III), cobre, ferro, manganês, níquel, chumbo e zinco. A precipitação de sulfetos é altamente eficiente na remoção de cádmio, cobalto, cobre, ferro, mercúrio, manganês, níquel, prata, estanho e zinco. A precipitação de carbonatos é eficiente na remoção de cádmio, níquel e chumbo. As principais desvantagens são a produção de grande quantidade de lodo e a emissão de H_2S , no caso de precipitação com sulfetos (ROQUE, 1997).

A troca iônica consiste na troca de íons de mesmo sinal entre uma solução e um corpo sólido muito insolúvel. Os trocadores de íons contêm íons ativos, ou contra-íons, que permutarão reversivelmente de posição com outros íons de uma solução, sem provocar modificação física no material. Os trocadores de íons têm uma natureza complexa e são, na realidade, polímeros. O polímero é portador de uma carga elétrica que é exatamente neutralizada por cargas dos contra-íons. Um trocador de cátions é constituído por um ânion polimérico e cátions ativos, enquanto que um trocador de ânions é um cátion polimérico com ânions ativos (MARTON, 2005).

Uma outra técnica que vem sendo amplamente estudada é a troca iônica por quelação. Em contraste com a técnica de troca iônica, a troca iônica por quelação apresenta a vantagem de remover íons específicos, como os de metais pesados, quando na presença de grandes quantidades de íons de metais alcalinos e alcalino-terrosos. Essa característica é importante uma vez que, na presença de grandes quantidades de sódio e potássio, a troca iônica é praticamente ineficiente (WASE; FORSTER, 1997).

A biorremocção de íons metálicos pode ocorrer de dois modos diferentes. O primeiro é independente da atividade metabólica da célula e é referido como biosorção ou remoção passiva. Este envolve a ligação do íon a parede celular ou a algum material extracelular de

organismos vivos. O segundo tipo de remoção de metais ocorre dentro da célula e é dependente do metabolismo celular, sendo referido como remoção intracelular, remoção ativa ou bioacumulação (WASE; FORSTER, 1997).

O uso de biomassas mortas parece ser uma alternativa preferencial para a remoção de metais. A ampla aceitação de células mortas deve-se a ausência de problemas relativos à toxicidade dos metais, ausência de requerimentos de crescimento e nutrientes e o fato que metais biosorvidos podem ser facilmente recuperados e a biomassa regenerada pode ser reutilizada (WASE; FORSTER, 1997).

3.3. BIORREMEDIAÇÃO

Uma das tecnologias que tem sido mais utilizada para remediação de áreas impactadas por derramamentos de petróleo e derivados é a biorremediação. Biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos são utilizados para remover ou reduzir (remediar) poluentes no ambiente. Este processo de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual como alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção (ALEXANDER, 1999). Embora outras tecnologias que usam processos físicos e/ou químicos sejam também indicadas para descontaminar ambientes poluídos, a biorremediação é uma alternativa ecologicamente adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e/ou metais tóxicos (ALEXANDER, 1999). Ao contrário de outros processos, a biodegradação elimina os contaminantes sem dispersá-los através dos solos. Os produtos finais desta degradação são dióxido de carbono, água e a biomassa microbiana (MAACHI et al., 2001). Seus benefícios, desde que utilizados de forma correta, recuperam ecossistemas contaminados, auxiliam no tratamento de resíduos e efluentes, bem como na desobstrução e limpeza de dutos e equipamentos. Todavia, se utilizada de forma inadequada, ou não sendo observados suas peculiaridades, a biorremediação pode desequilibrar o ecossistema.

De acordo com a Resolução 314, de 29/10/2002 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, entende-se por remediador o produto, constituído ou não por microrganismos, destinados à recuperação de ambientes e ecossistemas contaminados,

tratamento de efluentes e resíduos, desobstrução e limpeza de dutos e equipamentos, atuando como agente do processo físico, químico, biológicos ou combinados. Esta Resolução estabelece que os remediadores devem ser registrados no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente - IBAMA, para que possam ser produzidos, importados, comercializados e utilizados, ficando dispensados de registro àqueles que se destinam à pesquisa e experimento necessitando da aprovação do órgão.

Microrganismos encontrados no solo, águas subterrâneas e superficiais são capazes de degradar compostos orgânicos utilizando-os como fonte de energia. Em ambiente marinho foram listados 25 gêneros de bactérias, uma de algas e 27 de fungos; os mais comuns são: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Rhodospiridium* e *Sporobolomyces*. No solo, foram registrados 22 gêneros de bactérias e 31 de fungos: os fungos como *Penicillium* e *Cunninghamella* sp apresentam maior capacidade de degradação do que *Flavobacterium*, *Brevibacterium* e *Arthrobacter* sp (ROSATO, 1997).

O crescimento de microrganismos em hidrocarbonetos apresenta um problema particular, porque eles são imiscíveis na água. Muitas bactérias são capazes de emulsificar hidrocarbonetos em solução pela produção de agentes de superfície ativos, chamados de biossurfactantes, ao quais aumentam a adesão das células ao substrato, facilitando a biodegradação.

3.4. BIOSSURFACTANTES

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem de subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Algumas células microbianas apresentam elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas por si só como biossurfactantes, como algumas espécies de cianobactérias e alguns patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Serratia* sp. Bactérias do gênero

Acinetobacter produzem vesículas extracelulares que tem função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfactante. As vesículas e células microbianas com atividade surfactante são classificadas como biossurfactantes particulados (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Depois de produzidos no interior das células, os biossurfactantes podem ser lançados ao meio ou agir acoplados a parede celular (RON; ROSENBERG, 2001).

O maior mercado para os biossurfactante é a indústria petrolífera, onde são utilizados na recuperação de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes, outras aplicações incluem a biorremediação e a dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais, como na área medica onde os biossurfactantes podem ser usados como antibióticos, antifúngicos ou antivirais.

Atualmente nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam e também são estimuladas as pesquisas por novos compostos (RON; ROSENBERG, 2001; LANG, 2002; NITSCHKE; PASTORE, 2002; MULLIGAN, 2005).

3.5. BIORREMEDIAÇÃO COM CÉLULAS IMOBILIZADAS

As vantagens e desvantagens de se usar microrganismos e/ou nutrientes na forma imobilizada em biorremediação se justifica por vários fatores, alguns dos quais estão listados na tabela 1. Entretanto, dois fatores merecem destaque: o primeiro diz respeito ao fato de se estar levando ao meio ambiente um “fator novo” seja microrganismo ou nutriente de forma mais segura, porque se restringe sua relação com o meio ambiente como o todo, se relacionando somente com o sítio-alvo a ser atingido. O outro, de ordem econômica, é que não ocorrerão perdas ocasionadas pela diluição em ambientes aquáticos abertos, além da possibilidade de fazer com que as células ou nutrientes permaneçam na interface óleo/água, onde a biodegradação efetivamente ocorre (OH et al, 2000).

Tabela 1: Vantagens e limitações do uso de microrganismos encapsulados para aplicações em solo.

Vantagens

1. Reduzida possibilidade da contaminação do inóculo durante a estocagem, transporte e aplicação;
2. Reduzida possibilidade de derrames durante a aplicação;
3. Pode ser produzido em grandes quantidades, estocado por longos períodos liofilizados e usado em equipamentos mecânicos;
4. *Beads* feitos com suportes poliméricos naturais são biodegradáveis, não poluem e não são tóxicos;
5. Fornece proteção aos fatores ambientais bióticos e abióticos, aumentando a taxa de sobrevivência;
6. Aumento da atividade metabólica das células encapsuladas;
7. Liberação lenta de células com reduzido movimento pelo solo a partir do transporte induzido pelo fluxo da água;
8. Aumenta a estabilidade plasmidial.

Desvantagens

1. Solubilidade de gases e solutos podem ser restritas;
 2. Taxas reduzidas de consumo de oxigênio
 3. Alterações morfológicas e metabólicas podem ter um efeito negativo;
 4. Efeitos na atividade de água podem ser limitantes;
 5. Células podem não ter colônias estáveis fora dos *beads*, portanto aplicações repetidas dos *beads* podem ser necessárias.
-

3.6. IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS E ENZIMAS

A imobilização de células oferece um potencial promissor na melhoria da eficiência dos bioprocessos. Jianlong e Yi (1999) verificaram que os sistemas de tratamento de água, que empregavam células imobilizadas tinham um potencial em degradar compostos químicos tóxicos mais rapidamente devido à alta densidade dos organismos especializados que são

usados nestes sistemas. A expansão da biotecnologia e os desenvolvimentos esperados das pesquisas em genética têm estimulado a imobilização de enzimas e células (BICKERSTAFF, 1997).

As vantagens das células imobilizadas frente às células livres podem ser a recuperação de produtos mais facilmente e livres de contaminação com biomassa. Assim, os processos envolvendo células imobilizadas são mais eficientes para a utilização do substrato e biomassa, que podem ser usados em processos contínuos, assim como o uso de altas densidades de células. As desvantagens são os custos com imobilização ou limitações de transferência de massas criadas pelo suporte ou a densidade celular. O processo de imobilização de células e enzimas consiste em sua contenção em suportes neutros preservando suas propriedades funcionais, obtendo-se, desta forma, uma maior eficiência e produtividade em reações, ou em processos industriais. Vários suportes vêm sendo utilizados nos processos de imobilização e para as mais diversas finalidades, não existindo suportes de aplicação universal (KENNEDY; CABRAL, 1987). A escolha do suporte e dos procedimentos metodológicos adequados à imobilização depende das propriedades de células e enzimas, dos substratos, das condições físico-químicas das reações, dos produtos e da escala onde se desenvolverão estes processos (VAN DE VELDE et al., 2002).

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas e células, bem como a facilitação na separação dos produtos e aumento da estabilidade em solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Segundo Bickerstaff (1997) e Woodward (1988) existem cinco métodos principais de imobilização de células e enzimas, são eles: adsorção, ligação covalente, ligação cruzada, encapsulamento e aprisionamento (Figura 1).



Figura 1: Principais métodos de imobilização. Adaptado de BICKERSTAFF, 1997.

O uso de células aprisionadas em diversos tipos de suportes para utilização em aplicações ambientais é relativamente recente, seus relatos iniciaram com Chevalier e Noue (1985), que utilizaram microalgas imobilizadas em carragenana (polissacarídeo, extraído de algas), para o tratamento de águas residuais.

Desde lá muitas espécies microbianas têm sido encapsuladas em várias matrizes para diferentes aplicações. Linhagens de fungos encapsulados têm sido usadas para biocontrole e biodegradação, e microalgas encapsuladas têm sido investigadas para seqüestro de metais e remoção de nutrientes de resíduos em ambientes aquosos. O uso de bactéria encapsulada para a captura e degradação de compostos tóxicos também tem sido explorado (CASSIDY, 1996; JUNTER; JOUENNE, 2004).

Mais recentemente Quek et al. (2005) e Oh et al. (2000) utilizaram poliuretano para imobilizar *Rhodococcus sp.* e *Yarrowia lipolytica*, respectivamente, tendo como objetivo degradar e/ou remover petroderivados. Paje et al. (1998) utilizaram *Rhodococcus* imobilizados em alginato de cálcio para degradar benzeno. Outros aromáticos de interesse estudados foram o 2,4 e 4-clorofenol estudados por Jianlong e Yi (1999) e Quan et al. (2004)

respectivamente, os quais usaram bactérias imobilizadas para degradar tais compostos. Outros suportes como poliestireno, utilizado por Ionata et al. (2005), e polivinil álcool, empregado por Cunningham et al. (2004), também, foram utilizados para degradar amostras de pentano e solos contaminados, respectivamente.

Os suportes utilizados para a imobilização são, em sua maioria, insolúveis em água e possuem alto peso molecular (na maioria dos casos são polímeros hidrofílicos como a celulose). Um bom suporte para a imobilização de microrganismos não pode ser tóxico para as células, deve ter alta retenção de microrganismos, ser inerte quimicamente e bioquimicamente, ter resistência mecânica e alta difusividade de reagentes e produtos formados, para minimizar os efeitos do transporte de massa no processo (WANG; QIAN, 1997).

Os suportes empregados na imobilização podem ser orgânicos (naturais ou sintéticos) e inorgânicos (minerais ou sintéticos). Considerando a porosidade alguns autores consideram os suportes como porosos e não porosos. Os porosos são identificados nas seguintes categorias: com poros de tamanho controlado, com larga distribuição de poros e estrutura de gel. Nos suportes não porosos, a fixação é feita na superfície em contato imediato com o meio externo, onde os efeitos de difusão são mínimos, possibilitando a reação de grande quantidade do substrato. Os suportes não porosos têm a desvantagem de apresentar baixa área superficial, o que limita a fixação (KRAJEWSKA, 2004).

3.7. SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO: QUITINA E QUITOSANA

Suportes baseados em polímeros naturais, tais como celulose, dextrana, amido, quitina, quitosana ou agarose, podem ser alternativas úteis aos suportes inorgânicos para a técnica de imobilização, por causa da possibilidade de fazer ligações covalentes e também das dimensões bem definidas de seus poros (KRAJEWSKA, 2004).

A quitina é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de N-acetil-D-glucosamina (ou 2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose) em ligações β (1 \rightarrow 4), muito abundante na natureza, perdendo somente para a celulose em disponibilidade (Figura 2a). A quitosana (Figura 2b) é um heteropolissacarídeo derivado da N-desacetilação da quitina, embora também ocorra naturalmente na parede celular de alguns fungos (CHATTERJEE et al., 2005), constituído por resíduos de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina (ou 2-amino-2-deoxi-D-

glicose), unidos entre si por ligações β (1 \rightarrow 4). O grau de acetilação representa a proporção de unidades de N-acetil-D-glucosamina com respeito ao número total de unidades. Isto permite distinguir a quitina da quitosana. No caso da quitosana, o grau de acetilação é inferior a 50%. Este valor determina também o limite de solubilidade do polímero em soluções ácidas diluídas ($2 < \text{pH} < 6$) (CHATELET et al., 2001).

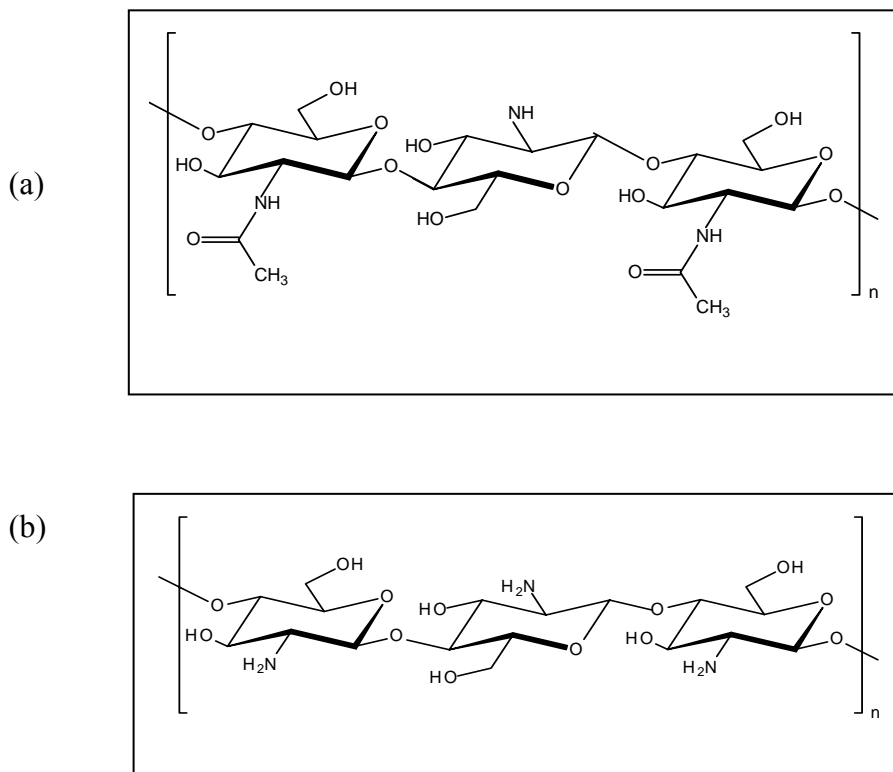


Figura 2 - Estrutura química dos polissacarídeos quitina (a) e quitosana (b).

Muitas são as possíveis aplicações destes biopolímeros, conforme mostra a tabela 2. A lista de aplicações de quitina e quitosana é ainda mais extensa quando são incluídos os vários derivados de quitosana obtidos por meio de reações químicas através das quais são inseridos diferentes grupos funcionais às suas moléculas, conferindo diferentes propriedades e aplicações (GAMZAZADE et al., 1997; KUMAR, 2000).

Tabela 2. Áreas de emprego de quitina e quitosana (KUMAR, 2000; TENG et al., 2001).

Área	Emprego
Biomédica	Biomembranas artificiais, Sutura cirúrgica
Farmacêutica	Agente cicatrizante, Aditivo de medicamentos Liberação controlada de drogas Controle de colesterol
Oftalmológica	Lente de contato
Cosmética	Umectante, Fungicida, Bactericida.
Indústria de Alimentos	Aditivos alimentares Nutrição animal Embalagem biodegradável para alimentos
Agricultura	Fertilizantes Liberação controlada de agroquímicos Defensivo agrícola
Biotecnologia	Imobilização de enzimas e de células Separação de proteínas Cromatografia Agente antimicrobiano
Indústria Têxtil e de Papel	Tratamento de Superfície
Indústria Fotográfica	Filmes
Tratamento de Efluentes	Remoção de íons metálicos Remoção de corantes Floculante e Coagulante

Embora muitas aplicações para o uso da quitina já tenham sido sugeridas, estudos com quitosana, seu principal derivado, tem despertado maior interesse. Isso decorre do fato da quitosana ser mais solúvel que a quitina, ampliando as possibilidades de aplicação na

indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia, inclusive na medicina (DUTTA; RAVIKUMAR; DUTTA, 2003).

Por ser biocompatível, biodegradável, pouco tóxico aos mamíferos e abundante na natureza, a quitosana tem sido foco de muitos estudos.

3.8. FONTES DE QUITINA E QUITOSANA NA NATUREZA

Quitina é encontrada no exoesqueleto de insetos, caranguejos, camarões, bem como nas estruturas internas de alguns invertebrados e na parede celular da maioria dos fungos. Quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina, embora seja encontrada naturalmente na parede celular de alguns fungos (CHATTERJEE et al., 2005). Comercialmente, entretanto, esses polímeros são obtidos a partir de resíduos de camarão.

A pesca de camarão é uma atividade de produção primária dependente de fatores econômicos, sociais e ambientais, praticada nos mais diversos ecossistemas: marinhos, estuarinos ou de água doce. O Brasil, por possuir vasto litoral e grande potencial hídrico, com várias bacias hidrográficas, além de uma grande biodiversidade de fauna marinha, possui grande potencial pesqueiro de camarões, sendo a produção brasileira de camarão por captura estimada em cerca de 22 mil toneladas anuais. Porém, seguindo a tendência mundial, a produção de camarão por captura está em declínio no Brasil, enquanto a produção do camarão em cativeiro (carcinicultura) tem aumentado. As dificuldades de abastecer a demanda mundial de animais marinhos apenas com a pesca é a principal razão do crescimento do cultivo em cativeiro destes animais (ROCHA; MAIA, 1998).

O Brasil é considerado como a nova fronteira para o desenvolvimento acelerado da carcinicultura, possuindo, após a China e a Índia, o maior potencial de crescimento da produção de camarão em cativeiro do mundo, em função de uma série de condições favoráveis que incluem clima, recursos hídricos e naturais, infra-estrutura de apoio, mercado interno em expansão e disponibilidade de amplas áreas aptas para o cultivo. Em 1999 o país foi o terceiro maior produtor do Hemisfério Ocidental, atrás do Equador e México, tornando-se um dos líderes mundiais em produtividade na carcinicultura, ou seja, em quantidade produzida por área de cultivo (PAQUOTTE et al., 1998).

No Brasil, a produção de camarão marinho foi iniciada na década de 70, na região Nordeste, com a introdução da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus*. A carcinicultura

brasileira, porém, começou adquirir caráter tecno-empresarial apenas no final da década de 80 (ROCHA; MAIA, 1998). De acordo com o mesmo autor, as improvisações praticadas até então começaram a ceder espaço ao profissionalismo e ao planejamento. A deficiência na tecnologia de produção de pós-larvas e de engorda da época, entretanto, forçou um cultivo extensivo das espécies nativas *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Farfantepenaeus paulensis* (NUNES; PARSONS, 1999). Após este período de experimentações, a carcinicultura só se consolidou quando o camarão branco do Pacífico (*L. vannamei*) foi introduzido no país, em meados da década de 90 (WAINBERG et al., 1998).

Segundo Pereira (2004), a introdução e a utilização desta espécie representou um grande avanço para o país, provocando o desenvolvimento da cadeia produtiva da carcinicultura brasileira. Em 2001, o contingente de mão-de-obra empregada nesta atividade chegava a quase 60.000 pessoas, sendo que a produção nacional chegou a cerca de 40.000 toneladas, a área cultivada a 8.500 ha e a produtividade média a mais de 4.700 kg/ha/ano.

Durante o processamento do camarão, através da etapa de descasque, são geradas grandes quantidades de resíduos sólidos, tendo em vista que cabeça e casca do animal correspondem a aproximadamente 40% de seu peso total, sendo tal resíduo composto por cerca de 70 a 75% de água (GILDBERG; STENBERG, 2001). Este resíduo é em geral clandestinamente enterrado ou jogado no mar ou em rios, causando problemas ambientais, principalmente em países grandes produtores de camarão onde não há rigor na fiscalização ambiental, a disposição final desde resíduos tem se tornado um grande desafio. Tendo em vista que tal resíduo é constituído por quitina (ZAKARIA et al., 1998), tem havido grande interesse em seu reaproveitamento, buscando alternativa à sua disposição final, com vistas ao desenvolvimento de produtos de valor agregado.

Atualmente, duas empresas brasileiras de pequeno porte (a Phytomare, localizada em Santa Catarina e a Polymar, localizada no Ceará) produzem quitosana de grau alimentício com o apoio de centros de pesquisas vinculados às respectivas Universidades Federais. O produto é classificado como alimento pelo Ministério da Saúde, sendo comercializado como redutor de peso e de colesterol (ASSENHAIMER; RUBIO, 2003).

O reaproveitamento de resíduos sólidos industriais tem também despertado grande interesse, já que tanto a legislação vigente quanto à fiscalização relacionadas à disposição final destes resíduos tornam-se cada vez mais rigorosas e atuantes. O emprego de resíduos industriais no tratamento de efluentes líquidos, principalmente como materiais adsorventes

alternativos, é muitas vezes vantajoso, pois além de remover contaminantes de efluentes, reduz o impacto ambiental causado pela disposição do próprio resíduo.

Devido às suas propriedades de floculação e coagulação, a quitosana tem sido bastante usada para a remoção de sólidos suspensos, turbidez, sendo usada até para a separação seletiva de proteínas (GUO et al., 2005). Pelo fato de ser mais economicamente atrativa, a quitosana se destaca dentre outros absorventes típicos, tais como: o carvão ativo, para a remoção de compostos orgânicos e corantes de águas residuárias, bem como a remoção de poluentes de águas residuais da criação de peixes (CHEN et al., 2002; CHUNG et al., 2005; GANDHIRAJAN; SWAMINATHAN, 1997),

A quitosana foi explorada com sucesso na coagulação de óleos e graxas dispersos em águas de campos petrolíferos. Embora não seja totalmente compreendido como a quitosana atua na absorção de substâncias oleosas, certo número de observações experimentais sugere dois tipos de mecanismo: o primeiro, envolve a atração eletrostática que pode ser comparada à atração de pólos magnéticos inversos; o segundo, sugere um tipo de entrelaçamento que pode ser comparado ao efeito de uma rede (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999).

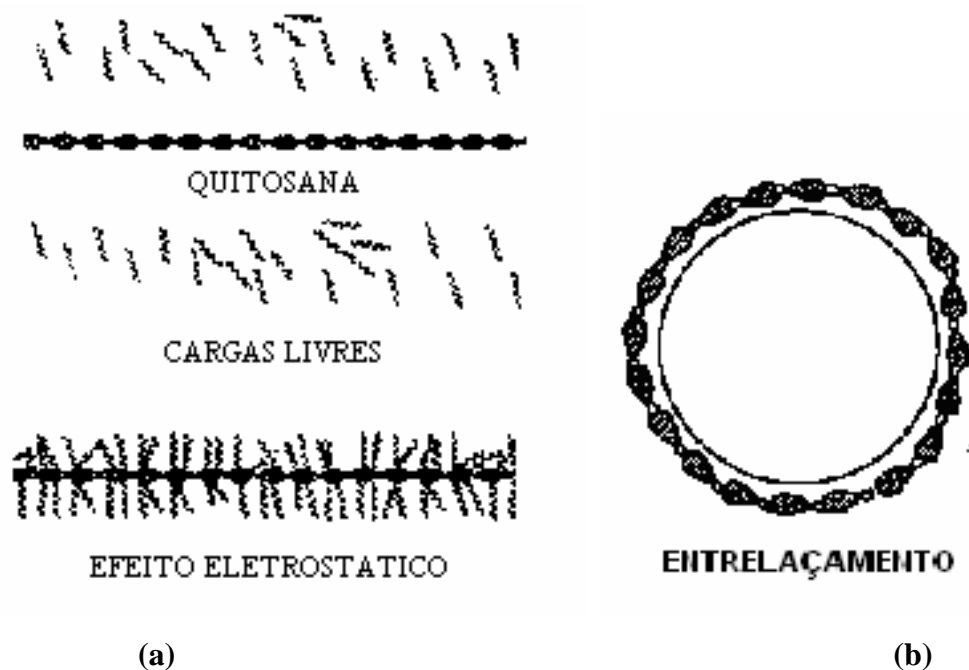


Figura 3: Atracção eletrostática (a); Entrelaçamento (b). Adaptada de CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999.

A farta disponibilidade de quitosana e ou de seus produtos, representa uma opção interessante para utilização como suporte para imobilização de microrganismos, devido as características peculiares desse polímero: ser biodegradável, possuir ação lipofílica, formar gel e esferas e a capacidade de reticulação (ATLAS, 1995).

3. IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS EM QUITOSANA

Uma das mais recentes linhas de pesquisa sobre quitosana diz respeito ao desenvolvimento de suportes para imobilização de células, fármacos e biomoléculas. Neste contexto, o polímero é utilizado como matéria-prima no desenvolvimento de membranas, filtros e microesferas (*beads*), os quais podem ser utilizados em diversos ramos da biotecnologia (GUIBAL et al., 2005). Apesar das excepcionais propriedades da quitosana, poucos são os trabalhos relatando o uso desse polímero para a imobilização de células. Isso decorre, provavelmente, da reconhecida atividade antimicrobiana da quitosana, o que dificulta o aprisionamento de células viáveis (LIU et al., 2004).

A preparação de *beads* ou microesferas é uma estratégia para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, uma vez que os *beads* possuem uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que a quitosana em flocos. Além disso, os *beads* apresentam cinéticas de adsorção mais rápidas e maior facilidade de manuseio e operação (GUIBAL et al., 2002).

Entretanto, é importante considerar que o peso molecular e o grau de desacetilação da quitosana influenciam substancialmente a formação dos *beads*. Diversos métodos desenvolvidos para a produção de *beads* nem sempre são reprodutíveis para quitosanas com características distintas. Desta forma, o tipo da quitosana utilizada no processo influencia o tamanho e a morfologia dos *beads* obtidos (GUIBAL et al., 2002).

O preparo de *beads* de quitosana pode ser realizado reagindo o polímero com quantidades controladas de ânions multivalentes, resultando em uma série de ligações inter cruzadas entre os polímeros. As ligações cruzadas podem ser obtidas em meio ácido, básico ou neutro, dependendo do método aplicado. Os *beads* de quitosana podem ser preparados por vários métodos tais como: ligações inter cruzadas por ânions, precipitação, formação de complexos, emulsão modificada e gelatinização ionotrópica. As ligações inter cruzadas podem ser obtidas por precipitação química, utilizando glutaraldeído ou com

uso de calor. A técnica de ligações cruzadas entre polímeros afeta a capacidade mucoadesiva dos *beads* (RORRER; HSIEN; WAY 1993).

As três principais metodologias empregadas para a obtenção de *beads* de quitosana com dimensões controladas são: i) Por coagulação, na qual a quitosana é dissolvida em meio ácido e gotejada em solução alcalina para formação dos *beads*; o entrecruzamento é executado após a obtenção e neutralização dos *beads*; ii) Por inversão de fases, sendo os *beads* obtidos *in situ* pela dissolução da quitosana em meio ácido contendo o agente de entrecruzamento e dispersão da fase aquosa em uma fase oleosa de maneira a obter materiais insolúveis e, iii) Pela técnica de *spray-drying*, na qual a quitosana purificada é dissolvida em meio ácido e a esta solução é adicionado um agente reticulante. A solução resultante é sugada por uma bomba do equipamento e os *beads* são formados pela ação do ar comprimido através do bico aspersor que interrompe o fluxo e promove a formação dos *beads*. Esta última é a técnica mais rápida e talvez a mais precisa das três citadas. A técnica mais simples é, sem dúvida, a de coagulação em meio alcalino pelo gotejamento do polissacarídeo dissolvido em ácido (HE; DAVIS; ILLUM, 1999).

Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis são compostos altamente desejáveis para a confecção de micro e nanoesferas conjugadas ou incorporadas com outros componentes ativos. A quitosana apresenta biocompatibilidade e biodegradabilidade dentre outras propriedades particulares, que permitem a sua manipulação em meio aquoso ácido de modo a conduzir a formação de micro ou nanoesferas conjugadas com compostos em que se deseje fazer uma liberação lenta, controlada ou até mesmo aumentar a eficiência da absorção de substâncias ativas (RORRER; HSIEN; WAY 1993).

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

3.10. REMOÇÃO DE METAIS POR QUITOSANA

Quitina e seu derivativo quitosana possuem características que tornam estes biomateriais aptos para atuarem como materiais adsorventes tanto de cátions metálicos quanto de ânions. A quitosana em pH ácido se comporta como um polieletrólito podendo interagir com colóides e outras espécies químicas negativamente carregadas.

A quitosana reage prontamente com substâncias carregadas negativamente como proteínas, polissacarídeos, ácidos graxos, vitaminas e sais minerais, além de absorver metais pesados [Cd (II), Cu (II), Cr (III), Pb (II), Zn (II) Ni (II), Hg (II), U (VI) e V (IV)] a partir de resíduos industriais, devido a presença de grupamentos aminos livres (BASSI ; PRASHER, 2000; LEE et al., 2001; 2005; GUIBAL, 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a carga superficial da quitosana muda drasticamente em função do pH das soluções, gerando uma carga positiva no adsorvente (SCHMUHL ; KRIEG, 2001). Esta mudança é esperada e é consistente com o pK_a que varia de 6,5 a 6,8. Os grupos aminos da quitosana são os sítios de maior eficiência na formação do complexo, adquirindo uma coordenação estável com íons metálicos de transição. Alguns grupos hidroxilas desprotonados podem envolver o íon metálico com boa coordenação (TIANWEI; XIAOJING; WEIXIA, 2001).

Soluções com pH muito baixo podem ocasionar a protonação dos grupos amino resultando numa carga reversa e numa diminuição gradativa na habilidade do polímero formar o complexo com o metal. Sugere-se uso de soluções com pH neutro, onde se verifica uma maior adsorção pela quitosana (NGAH; ENDUD; MAYANAR, 2002; SCHMUHL; KRIEG, 2001).

A capacidade máxima de adsorção deste polímero modificado também é estudada. Os modelos de isotermas mais usados são Langmuir e Freundlich. O primeiro estuda a adsorção em sistema homogêneo (monocamada – superfície plana) e o segundo descreve a adsorção em sistema heterogêneo (bicamada). As capacidades máximas de adsorção teóricas são calculadas a partir da obtenção dos gráficos de linearização das equações dos dois modelos, onde o modelo que melhor descreve o processo de adsorção é aquele que apresenta um maior valor de coeficiente de correlação e um menor valor de desvio padrão entre os valores experimentais (FÁVERE, 1994; GUPTA, 1998).

3.10.1. Teoria da adsorção

Diferentes modelos têm sido propostos para explicar a formação de complexos da quitosana com metais. O primeiro é o chamado modelo do pendente que considera que o íon metálico está ligado a um grupo amina como um pendente. O segundo modelo, o da ponte, supõe que o íon metálico está ligado a vários átomos de nitrogênio da mesma ou de cadeias diferentes. Estudos recentes com oligômeros indicam que ocorrem os dois tipos de complexação, sendo o primeiro mais estável em pH 5,0 - 5,8 e o segundo, predominante, em pH acima de 5,8 (MODESTO, 2003).

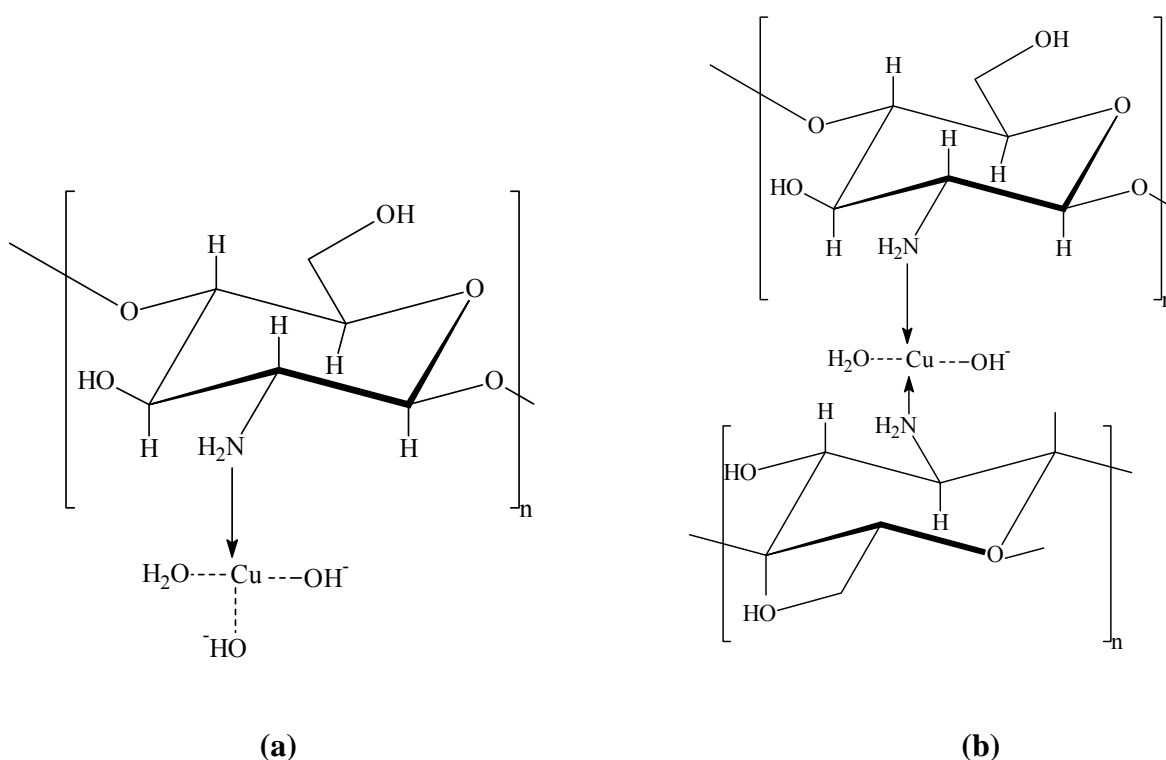


Figura 4. Estruturas propostas para complexos de Cu (II) com quitosana: (a) Modelo do pendente; (b) Modelo da ponte.

Entretanto, a interação dos íons metálicos com a quitosana não está ainda totalmente entendida, devido à possibilidade de envolvimento da hidroxila do carbono 3, formando um quelato (MODESTO, 2003)

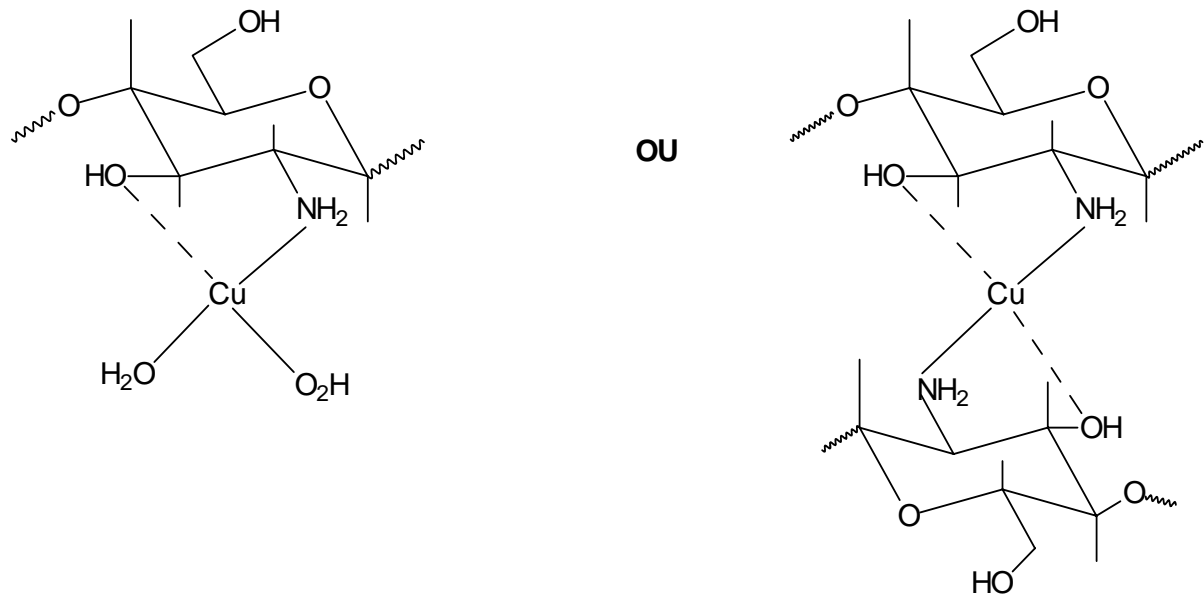


Figura 5. Estruturas propostas para complexos de Cu com quitosana com a participação da hidroxila C3.

A cinética de adsorção é controlada principalmente pelas etapas de difusão e processos de reação. As etapas de transferência de massa e difusão para dentro da estrutura interna da partícula permanecem como etapas determinantes da velocidade. Enquanto a transferência de massa ocorre nos primeiros minutos do processo, a difusão intrapartícula pode ocorrer dentro de um período de várias horas, constituindo a etapa principal do processo de adsorção (MODESTO, 2003).

3.10.2. Isoterma de adsorção

Quando um certo adsorvente é mantido em contato com um dado volume de um líquido contendo um soluto, ocorre adsorção até o equilíbrio ser atingido. O equilíbrio é caracterizado por uma certa concentração do soluto no adsorvente e uma associada concentração final do soluto na fase líquida. Em sistemas simples pode-se traçar uma curva de concentração do soluto na fase sólida em função de concentração do soluto na fase líquida. Essas curvas dependentes da temperatura são chamadas de isotermas de adsorção. Há vários tipos de isotermas, existindo vários mecanismos e equações propostas. Dentre os modelos de isotermas mais utilizados, destacam-se os de Freundlich e de Langmuir (COONEY, 1999; WASE ; FORSTER, 1997; CHUI, et al., 1996; GUPTA, 1998).

3.10.3. Isoterma de Langmuir

De acordo com Cooney (1999), uma isoterma simples com alguma base teórica e aplicável em adsorção em superfícies homogêneas com pouca interação entre as moléculas adsorvidas (soluto diluído) envolve o modelo de isoterma de Langmuir.

É caracterizada por uma aproximação monotônica a uma quantidade limite de adsorção, e que se presume corresponder à formação de uma monocamada. A isoterma de Langmuir corresponde a um tipo de adsorção onde se presume que:

a) as moléculas são adsorvidas em pontos discretos da superfície que são chamados "sítios de adsorção";

b) a energia de uma espécie adsorvida é a mesma em qualquer ponto da superfície e é independente da presença ou ausência de moléculas adsorvidas na vizinhança, isto é, a superfície é completamente uniforme sob o ponto de vista energético;

c) a quantidade máxima possível de adsorção é a que corresponde à monocamada. A adsorção é localizada e ocorre por colisão de moléculas com sítios vazios.

A seguinte expressão pode ser utilizada para isoterma de Langmuir.

$$Q = \frac{Q_{\max} \cdot K C_e}{1 + K C_e} \quad \text{equação (1)}$$

Onde Q é a quantidade do metal adsorvido em ppm (parte por milhão) por grama de adsorvente, no equilíbrio; Ce é a concentração no equilíbrio ou concentração final do metal na solução; Q_{max} (capacidade máxima de adsorção) é o valor de saturação da monocamada em mg por grama e não depende da temperatura na ausência de interferência do solvente. A constante K (medida da energia de adsorção) relaciona a adsorção específica (Q) na faixa de concentração muito diluída.

3.10.4. Isoterma de Freundlich

Ainda segundo Cooney (1999), a equação de Freundlich representa uma relação quantitativa, em que a adsorção do soluto aumenta indefinidamente com o aumento da concentração. É freqüentemente utilizada para descrever equilíbrio de adsorção em sistema com superfície heterogênea assumindo que a energia de distribuição para os sítios de adsorção é essencialmente exponencial, portanto não assume adsorção monocamada. É descrita pela equação:

$$\text{Log } Q_e = \log P + 1/n \text{ Log } C_e \quad \text{equação (2)}$$

Onde P mede a capacidade de adsorção do adsorbente e 1/n a intensidade da adsorção em função da concentração do soluto. Em laboratório pode-se obter experimentalmente a isoterma de adsorção, por ambos os modelos de Langmuir e Freundlich, envolvendo sistema de batelada e coluna de leito fixo:

3.11. ADSORÇÃO EM BATELADA

Uma massa do adsorbente é selecionada e misturada com um certo volume da solução de um soluto com concentração inicial conhecida. A mistura adsorbente/soluto é agitada e após o equilíbrio de adsorção ser alcançado determina-se a concentração de equilíbrio (residual) do soluto na solução. Relacionando-se a massa (ou moles) do soluto adsorvido no adsorbente, por unidade de massa de adsorbente, obtêm-se a capacidade de adsorção do adsorbente (MCKAY, 1996; PINZON BELLO, 1997).

3.12. ADSORÇÃO EM LEITO FIXO (COLUNA)

Devido à própria inconveniência e os custos relativamente altos para o transporte contínuo das partículas sólidas, quando se utilizam operações em batelada, é freqüentemente utilizada a adsorção em leito fixo. Essa operação é mais econômica e trata-se basicamente de passar a solução através de um leito contendo os sólidos adsorventes (MCKAY, 1996; GUPTA, 1998). Esta técnica é amplamente usada e encontra aplicações em diversos campos, como pode exemplificar: na descoloração de óleo (vegetais e minerais) e na purificação de proteínas.

3.13. PROPRIEDADES FÍSICAS DE MATERIAIS

As propriedades elásticas são características importantes da resistência dos materiais. O corpo de prova é estendido a uma velocidade padrão constante até a sua ruptura (ASTMD 412). A resistência à tração é avaliada pela carga aplicada por unidade de área no momento da ruptura (Figura 6A). O alongamento representa o aumento percentual do comprimento da peça sob tração, no momento da ruptura (Figura 6B). O módulo de elasticidade ou módulo de Young é medido pela razão entre a tensão e a deformação, dentro do limite elástico, em que a deformação é totalmente reversível e proporcional à tensão (Figura 6C). Os módulos a 100%, 200% e 300% são utilizados para caracterizar os elastômeros e descrevem não o módulo real, mas a tensão necessária para produzir deformações de 100%, 200% e 300%.

A resistência à tração e o alongamento na ruptura, podem ser correlacionados quantitativamente com a estrutura do polímero. Materiais com grande teor de ligações cruzadas, como os utilizados nas espumas rígidas, são fortes e duros, porém quebradiços, e os elastômeros e as espumas flexíveis tem alongamento na ruptura muito maior. A parte inicial em linha reta da curva de tensão/deformação, onde o material exibe perfeita elasticidade, representa o desenovelamento e alinhamento das cadeias macromoleculares longas e flexíveis. Extensão posterior do polímero acarreta deslizamento das macromoléculas com o rompimento de ligações secundárias entre cadeias adjacentes, podendo resultar em deformações permanentes (Figura 6D). O teste de determinação da resistência à tração em espumas flexíveis é descrito na Norma brasileira NBR 8515 da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

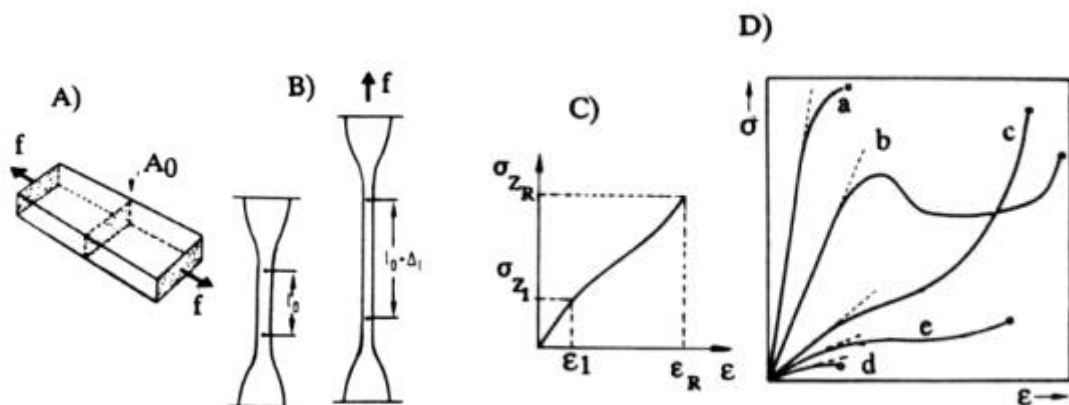


Figura 6: A) Resistência à tração: $\sigma_z = F / A_0$ (força de tensão) / A_0 (área de seção reta inicial); B) Alongamento: $e = (\text{variação do comprimento}) / (\text{comprimento inicial})$; C) Diagramas tensão x deformação; D) Curvas típicas de tensão x deformação: a) Material duro quebradiço; b) Material duro e resistente; c) Material elástico; d) Material macio e fraco; e) Material macio e resistente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DE QUITINA A PARTIR DE CARAPAÇAS DE CAMARÃO

A quitina obtida para ser utilizada neste trabalho foi conseguida a partir de carapaças de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* oriundas da despesca de camarões de fazendas localizadas no município de Aracati, Ceará. As cascas foram lavadas em água corrente, e secas ao sol durante uma semana. Em seguida, foram moídas e peneiradas. A fração de pó de diâmetro médio 0,42 mm foi utilizada no processo de extração que envolveu um tratamento com ácido clorídrico, para desmineralização, um tratamento com hidróxido de sódio, para promover a desproteínização, seguido do tratamento com hipoclorito de sódio para remoção de pigmentos (CANELLA; GARCIA, 2001).

Minerais, proteínas e pigmentos se encontram firmemente associados com a matriz polimérica de quitina na casca do camarão. Assim sendo, 220g do pó foram inicialmente suspensas em 2L HCl 0,1N e mantido sob agitação durante 3h à temperatura ambiente. Durante essa etapa foram adicionados 100 mL de 1-Octanol para diminuir o efeito do gás carbônico gerado, evitando-se, assim, o transbordamento do material. O material resultante desse processo foi filtrado em pano de algodão e o sólido foi lavado diversas vezes com água destilada para eliminação dos sais de cálcio. A extração de proteínas foi feita através de tratamento com NaOH 3%, sob agitação constante, a 70°C, durante 3 h. O material desproteínizado foi filtrado e lavado com água destilada até a neutralidade. Ao material resultante foi adicionado NaOCl contendo 3% de cloro ativo, por 2 h. Nesta fase, foram removidos os pigmentos contidos na matriz polimérica. Ao final, foi obtida uma quitina de aspecto flocular e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos (CANELLA; GARCIA, 2001).

4.2. OBTENÇÃO DE QUITOSANA

O procedimento para obtenção de quitosana foi feito de acordo com Suryanarayana et al. (1987), com modificações. Para tanto, 10g de quitina pulverizada foram suspensas em 300 mL de NaOH 50% e mantida sob agitação durante 1h. Para facilitar a desacetilação da quitina, a mistura foi aquecida a 120°C e então mantida nessa temperatura, sob agitação, por 4,5h. A quitosana resultante foi lavada com água destilada até pH neutro e depois com etanol e acetona, para desidratar a quitosana. O produto final foi seco a 60°C por 12h.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DE QUITOSANA

4.3.1. Identificação por infravermelho

O grau de N-acetil das amostras de quitosana foi determinado por Infravermelho através do método proposto por Moore e Roberts (1980). Inicialmente 200mg de quitosana pulverizada foram colocados para secar em estufa a 80°C por 12 horas antes da análise. Em seguida 40mg de quitosana seca foram misturados com 120mg de Brometo de potássio (KBr). 40mg dessa mistura foram colocados em uma prensa e então compactada por pelo menos 30 minutos para produzir um disco fino e transparente. Esse disco de quitosana-KBr foi analisada na região entre 400-4000 cm em espectrofotômetro (Perkin-Elmer, Modelo Spectrum One, USA).

Foram analisados três discos para cada amostra de quitosana. Os espectros de infravermelho foram comparados com o espectro de uma amostra padrão de quitosana, analisada sob as mesmas condições. Os máximos de absorção dos espectros de infravermelho obtidos com as amostras testes foram comparados com a posição e a intensidade relativa dos picos obtidos com a quitosana padrão.

4.3.2. Perda por dessecação

Para determinação da umidade foram pesados aproximadamente 500mg de quitosana em um cadinho previamente tarado. Em seguida, a amostra foi seca em estufa por 3-4 horas a 105 °C ± 4 °C. Após esse tempo o cadinho foi retirado da estufa, resfriado em um dessecador por 1h e pesado. A umidade foi calculada a partir da seguinte equação (USP 23, 1995).

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

equação (3)

Onde: P = Peso da quitosana.

Q = Peso da quitosana seca.

4.3.3. Determinação do pH

Para determinação do pH, 1g de quitosana foi dispersado em 100 mL de água destilada em um erlenmeyer de 250 mL. Essa suspensão foi agitada por 15 minutos e o pH medido em um potenciômetro previamente calibrado com tampões padrões de pH 4,0 e pH 7,0 (USP 23,1995).

4.3.4. Resíduo de ignição

O teor de cinzas foi determinado incinerando-se 1g de quitosana pulverizada em um cadinho previamente calcinado e tarado em mufla a 500-600 °C durante 3 h. Ao final, a amostra foi colocada em um dessecador para esfriar, após o que foi pesada e o teor de cinzas calculado (USP 23, 1995).

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100\% \quad \text{equação (4)}$$

4.3.5. Grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação da quitosana foi estimado através de titulação potenciométrica. Para tanto, 0,5 – 1g de quitosana foram dissolvidos em 30-60 mL de HCl 0,1N à temperatura ambiente. A essa solução foram adicionadas algumas gotas de solução aquosa de alaranjado de metila 0,1%. Essa solução foi titulada em potenciômetro com hidróxido de sódio 0,1N até a viragem do pH para o vermelho (pH 3,1) ou amarelo (pH 4,4). O grau de desacetilação foi calculado a partir da seguinte equação (DOMARD; RINAUDO, 1993).

$$\text{Grau de desacetilação (GD)} = \frac{C_1 V_1 - C_2 V_2}{G} \times 0,0162 \times 100\% \quad \text{equação (5)}$$

Onde: C_1 = Concentração do HCl

V_1 = Volume do HCl

C_2 = Concentração do NaOH

V_2 = Volume de NaOH

G = Peso da amostra

4.3.6. Teor de material insolúvel

A concentração de material insolúvel associado a quitosana foi determinada gravimetricamente. Para tanto, 10g de quitosana foram dissolvidos em 50 mL de ácido acético 1% e a essa solução foram adicionados 200 mL de água destilada. A solução foi agitada por 1 hora e em seguida, filtrada em funil de placa sinterizada previamente seco e tarado. O funil foi lavado com 200 mL de acetona PA, seco em estufa a 105 °C e pesado (USP 23, 1995).

4.3.7. Viscosidade

A viscosidade de uma solução de quitosana em ácido acético 1% a 25 °C foi determinada com o auxílio de um viscosímetro (Brookfield, Modelo LVT DV-II+ Spindle S 31, USA) previamente calibrado com uma solução padrão (Marca, Cannon Instrument Company, USA), variando de 15 a 100 cps (centpoise). Para a medida 5g de quitosana foram dissolvidas em 500 mL de ácido acético 1% e agitada durante 1 hora em um becker de 600 mL de forma alta, após o que a viscosidade foi determinada.

4.3.8. Determinação do peso molecular médio por viscosimetria

O peso molecular da quitosana foi estimado por viscosimetria seguindo a metodologia proposta por Terbojevich e Cosani (1997). A medida foi feita em uma solução a 0,6% de quitosana em ácido acético 1%, utilizando-se um viscosímetro de Ubbelohde (Modelo 0C B806, Cannon Instrument Company, USA).

Inicialmente o viscosímetro foi lavado exaustivamente com água destilada e depois com a solução de ácido acético 1%. Em seguida, o viscosímetro foi colocado em um banho-maria regulado a 25 °C ± 1°C e foi determinada a viscosidade do ácido acético 1% (8 mL), fazendo-se a leitura do tempo de escoamento em triplicata, para se obter a média aritmética. Foram analisadas cinco soluções de quitosana, variando de 0,3% - 0,6%, preparadas na mesma solução, sempre em triplicata.

Tratamento dos dados:

- Determinar a viscosidade específica para cada solução de quitosana utilizando a seguinte fórmula: $(ns) = T - T_s / T_s$ **equação (6)**

Onde T é o tempo médio de escoamento da solução de quitosana e T_s é o tempo médio de escoamento do solvente.

- Determinar a viscosidade intrínseca para cada solução de quitosana utilizando a seguinte fórmula $[\eta] = ns/c$ **equação (7)**

Onde c (concentração da solução) e ns (viscosidade específica).

- Plotar uma curva da viscosidade intrínseca x concentração e determinar a inclinação linear desta curva. O valor da linear é a viscosidade intrínseca a ser utilizada para determinar o peso molecular médio da quitosana através da fórmula :

$$[\eta] = K \cdot M^a \quad \text{equação (8)}$$

onde $K = 2,1 \times 10^{-4}$ e $a = 0,88$ para este solvente e a 25 °C.

4.4. PREPARAÇÃO DE ESFERAS DE QUITOSANA

Para preparação das esferas, 20g de quitosana foram dissolvidos em 500 mL de ácido acético 1%. Essa solução foi gotejada sobre uma solução de hidróxido de sódio 8% (p/v) com o auxílio de sistema elétrico de agulhas calibrado para liberar gotas padronizadas de 0,1mm (Figura 7). As microesferas permaneceram na solução de hidróxido de sódio 8% (p/v), sob agitação mecânica por 24h. Ao final as microesferas foram lavadas com água destilada até pH neutro e secas a 30°C (RORRER; HSIEN; WAY, 1993).



Figura 7: Sistema de produção de esferas de quitosana.

4.5. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DA CEPA PFA 001 E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A cepa PFA001, previamente isolada de uma amostra de petróleo, foi identificada através de análise do rDNA 16S no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia, sob a responsabilidade do Dr Thalles Barbosa Grangeiro. Essa cepa encontra-se depositada na coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMI) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Para a produção de biomassa a bactéria foi cultivada em meio de Agar Nutritivo em placa a 37 °C por 24h. Após esse período duas colônias foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 9 mL de Caldo Nutritivo e esse tubo foi incubado a 37 °C por 4h. A densidade dessa cultura foi ajustada para uma absorbância 0,1 a 600 nm (Espectrofotômetro ThermoSpectronic Modelo Genesys 10 uv, USA). Essa cultura foi usada para inocular um meio mineral preparado com a seguinte composição por litro de água destilada: K₂HPO₄ (13,99g); KH₂PO₄ (6,0g); MgSO₄.7H₂O (0,2g); (NH₄)₂.SO₄ (4,0g). Este meio foi esterilizado a 110 °C por 10 min, em autoclave, e após esfriar recebeu uma solução de micronutrientes (EDTA (2,5g); ZnSO₄.7H₂O (10,95g); FeSO₄.7H₂O (5,0g); MnSO₄.H₂O (1,54g); CuSO₄.5H₂O (0,392g); Co(NO₃)₂.6H₂O (0,25g); Na₂B₄O₇.10.H₂O (0,177g), 1000 mL de água destilada), na proporção a 0,1% (v/v). A solução de micronutrientes recebeu algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado para evitar precipitação e foi esterilizada por filtração (membrana 0,45 µm, Millipore, USA).

A cultura da bactéria com a densidade ajustada para 0,1 de absorbância a 600 nm foi inoculada na proporção de 1% (v/v) em um Erlenmeyer de 2L contendo 0,5L de meio mineral enriquecido com 0,4% de extrato de levedura (esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 min) e 2% de glicerol previamente esterilizado por filtração (0,45 µm Millipore, USA). Essa cultura foi mantida sob agitação a 160 rpm, a 28-30 °C por 48 h. Ao final, a cultura foi inativada por aquecimento a 100 °C por 10 min, após o que foi centrifugada a 1000g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com água destilada (3x), sob centrifugação nas mesmas condições. A biomassa foi liofilizada (GOMES, 2004).

4.6. IMOBILIZAÇÃO DA CEPA PFA001 EM ESFERAS DE QUITOSANA

Para imobilização 4g de quitosana ($MM < 125$ Da) foram misturados com 4g de biomassa bacteriana e dissolvidos em 100 mL de ácido acético 1% incubada a 25 °C por uma hora sob agitação. Depois foi dispensada gota a gota em uma solução de NaOH 8% para formação das esferas. As esferas ficaram nessa solução, em repouso por 12-14h, após o que foram lavadas com água destilada até pH neutro.

4.7. MEDIDA DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE

As esferas com a bactéria imobilizada foram utilizadas em ensaios de emulsificação de acordo com a metodologia proposta por Igbal et al. (1995). Nesse ensaio 2 mL das microesferas úmidas foram colocadas em um tubo de ensaio com tampa rosqueada e sobre elas foram adicionados 2 mL de um hidrocarboneto e 200 μ L do corante rosa de bengala, para facilitar a visualização da camada emulsificada. O tubo foi agitado em *vortex* por 2 min, e depois deixado em repouso por 24h. O percentual de emulsificação (E24) foi calculado dividindo-se a altura da camada emulsificada (mm) pela altura da camada total de líquido (mm), multiplicando-se por 100.

4.8. PRODUÇÃO DE FILMES E MEMBRANAS DE QUITOSANA

Para preparação das membranas foram dissolvidos 2g de quitosana, com 78% de desacetilação, em 100mL de solução de ácido acético 1%, e essa solução foi mantida sob agitação durante 4h. Após esse tempo, a solução foi filtrada em funil de placa sinterizada de grau 2, para remoção de alguma impureza, e derramada em uma placa de vidro com bordas. O volume da solução foi rigorosamente controlado para obtenção de membranas de espessura padronizada. O gel de quitosana foi seco em estufa a 50°C. Após completamente seca, foi desprendida da placa pela adição de uma solução de NaOH 1N ou 10% para neutralizar o ácido. Em seguida foi neutralizada através de lavagens com água destilada (ASSIS; SILVA, 2003). As membranas foram secas esticadas, para evitar enrugamentos.

Para obtenção dos filmes, as membranas após neutralização foram imersas em uma solução de glicerol 20% (v/v) por 30 minutos. Após esse tratamento os filmes foram secos, bem esticados, a 25-30°C.

As espessuras dos filmes e membranas foram determinadas em paquímetro digital (Marca Mitutoyo, Kanagawa, Japão).

Para a obtenção de filmes e membranas com a bactéria imobilizada foram incorporados 2g de biomassa seca a solução de quitosana 2%, de forma a obter-se uma proporção 1:1 (m:m), procedendo-se então como descrito.

4.9. TESTE DE SOLUBILIDADE DOS FILMES E MEMBRANAS EM pH 6

Os filmes e membranas ainda úmidos foram cortados no formato de discos de 2 cm de diâmetro e postos para secar por 3h e 30min a 105°C. Em seguida foram colocados para resfriar em um dessecador e então pesados. Esses discos foram colocados individualmente em béqueres de 100 mL contendo 20 mL de uma solução tampão de acetato de sódio 0,5 M pH 6. Essas preparações foram mantidas sob agitação durante 24h. Após esse tempo, os filmes e membranas foram lavados com água destilada até a neutralidade e secos a 105 °C durante 3h e 30min. Em seguida, esses filmes e membranas foram colocados para resfriar no dessecador e foram pesados. As massas dos discos antes e após o tratamento foram comparadas. Esses ensaios foram feitos em duplicata (GARCÍA et al., 2004).

4.10. PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES E MEMBRANAS DE QUITOSANA

Os filmes membranas de quitosana foram submetidos a ensaios de tração em uma máquina de tensão dinâmica, com carga máxima de 380 N. As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas quanto à tensão de ruptura (força dividida pela área), alongamento e elasticidades ou módulo de Young (BRITTO; CAMPANA-FILHO; ASSIS, 2005).

4.11. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Amostras de quitosana em flocos, esferas, filmes e membranas com ou sem a bactéria imobilizada foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (Philips, Modelo ETAX-XC 30, USA). Para observação, as amostras secas foram previamente metalizadas com uma fina camada de ouro (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 2001).

4.12. ESTUDO DA ADSORÇÃO DE ÍONS Cu (II) E Pb (II) COM FILMES E MEMBRANAS DE QUITOSANA COM E SEM BACTÉRIAS IMOBILIZADAS

Filmes e membranas (aproximadamente 0,15 mm de espessura) de quitosana com ou sem a bactéria imobilizada foram cortados no formato de discos de 3 cm de diâmetro e montados em uma das extremidades de colunas de vidro de 2 x 13cm de comprimento. As colunas foram preenchidas com 5mL de uma solução de Cu (II) na concentração 88,52 ppm, ou com uma solução de Pb (II) na concentração de 85,60 ppm, previamente determinadas por absorção atômica (Marca GBC, Modelo 933 PLUS, USA), ambas ajustadas a pH 6. Esse experimento foi realizado em duplicata para determinação da concentração de equilíbrio do íon metálico.

As soluções recolhidas após filtração foram armazenadas em geladeira para posterior determinação da concentração de equilíbrio dos metais por espectrometria de absorção atômica. Foi anotado o tempo de escoamento das soluções dos dois metais por mililitro até os 5mL escoados, e as soluções que não escoaram permaneceram em contato com os filmes dentro das colunas por até 24 h.

4.13. REMOÇÃO DE Cu (II) E Pb (II) DE AMOSTRAS DE ÁGUAS CONTAMINADAS POR ESFERAS DE QUITOSANA COM E SEM BACTÉRIAS IMOBILIZADAS

Amostras de água doce e marinha foram filtradas e ajustadas a pH 6 e em seguida foram adicionados 2 e 20mg de Cu (II) e Pb (II), respectivamente, para que as amostras ficasse com a concentração final de 20ppm e 200ppm. Em seguida, 100 mL destas soluções em alíquotas de 20 mL, foram percoladas nas colunas recheadas com esferas de quitosana com e sem a bactéria imobilizada, a uma velocidade de fluxo de 1,0 – 1,5 mL/min. O íon metálico retido foi eluído com 10 mL de ETDA 1M. Todas as frações obtidas durante as etapas de percolação da amostra e eluição na coluna foram coletadas e analisadas por espectrometria de absorção atômica (Marca GBC, Modelo 933 PLUS, USA).

3.14. ESTUDO DA ADSORÇÃO DE Cu (II) E Pb (II) EM BATELADA

Os experimentos foram realizados em frascos de vidro (50 mL) contendo 0,5g de microesferas úmidas de quitosana com e sem bactérias imobilizadas. Nestes frascos foram adicionados 50 mL de soluções sintéticas de Cu(II) ou Pb(II), variando de 100 a 700 ppm em pH 6. Essas soluções foram mantidas sob agitação, em temperatura ambiente, durante 24h, após o que foram filtradas e os sobrenadantes analisados por espectrofotometria de absorção atômica (Marca GBC, Modelo 933 PLUS, USA). A capacidade de adsorção do adsorvente, Q_e , (em mg metal/ grama do adsorvente) foi determinada pela equação abaixo:

$$Q_e = \frac{(C_o - C_e)V}{m} \quad \text{equação (9)}$$

Onde C_o e C_e são as concentrações (ppm) do soluto na solução inicial e de equilíbrio, V é o volume da solução (L) e “ m ” a massa do adsorvente em gramas.

As isotermas de adsorção de equilíbrio do sistema (caracterizadas pela curva de concentração do soluto na fase sólida em função de concentração do soluto na fase líquida) foram estudadas empregando-se as equações linearizadas de Langmuir e de Freundlich,

$$\text{Equação de Lagmuir: } \frac{1}{Q} = \frac{1}{Q_{\max}} + \left(\frac{1}{Q_{\max} K} \right) \left(\frac{1}{C_e} \right) \quad \text{equação (10)}$$

Onde C_e é a concentração no equilíbrio ou final do soluto na solução (mg/L), Q é a quantidade do soluto adsorvido por grama de adsorvente no equilíbrio (mg/g), Q_{\max} é a capacidade máxima de adsorção (mg/g) e K é a constante de equilíbrio da isoterma de Langmuir (L/mg).

$$\text{Equação de Freundlich: } \log Q = \log P + 1/n \log C_e \quad \text{equação (11)}$$

Onde: Q é quantidade de soluto adsorvido (mg/g), C_e é a concentração de equilíbrio em solução (mg/L), $1/n$ é a constante de Freundlich, P é a constante de adsorção de Freundlich. Os valores de $1/n$ e P representam a intensidade da adsorção e a capacidade de adsorção do adsorvente.

4.15. ESTUDO DA ADSORÇÃO DE Cu (II) E Pb (II) EM LEITO FIXO

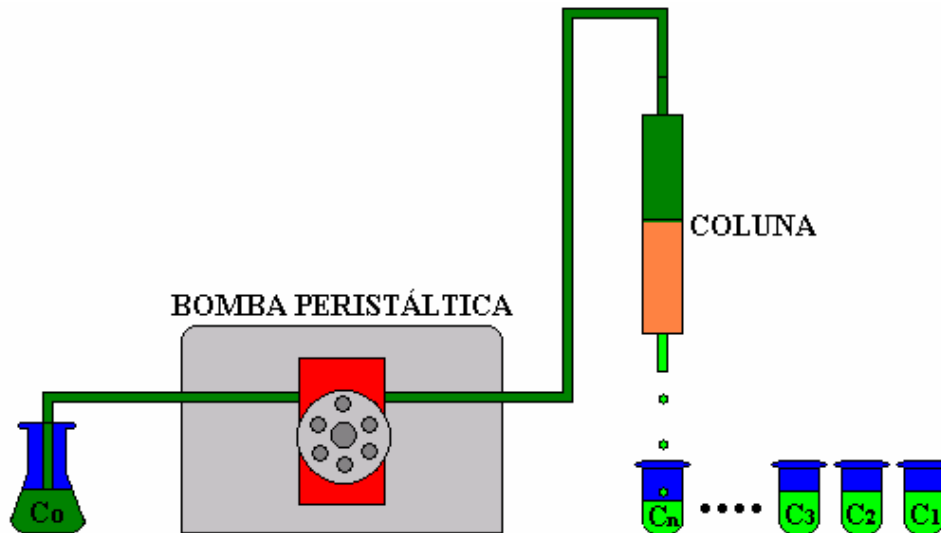


Figura 8: Sistema de remoção dos metais traços Cu (II) e Pb (II) em coluna de esferas de quitosana.

Os estudos de adsorção de leito fixo foram realizados em colunas de vidro de 20 mL com 0,8 cm de diâmetro, recheadas com 0,3g de esferas de quitosana com e sem a bactéria imobilizada, em fases intercaladas com discos porosos de algodão, para evitar flutuações do material. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio pH 6 e, então, percolada com volumes de 10 a 50 mL de solução sintética dos íons, a pH 6, com velocidade de 0,6 a 1,0 mL/min.

Os estudos de dessorção dos íons adsorvidos na coluna foram realizados com soluções de ETDA 1M.

A capacidade de adsorção no leito fixo foi determinada medindo-se a concentração dos compostos na solução por espectrofotometria de absorção atômica (Marca GBC, Modelo 933 PLUS, USA), antes e após passar pela coluna, de acordo com a equação:

$$Q \text{ (mg/g)} = \frac{\text{Quantidade do soluto adsorvida na coluna}}{\text{Quantidade do adsorvente na coluna}} \quad \text{equação (12)}$$

4.16. PREPARAÇÃO DE HIDROGÉIS DE QUITOSANA COM E SEM A BACTÉRIA PFA001 IMOBILIZADA

Géis de quitosana variando de 0,1% a 1% preparados em ácido acético 1%, com e sem a bactéria imobilizada (1:1, m/m), foram utilizados em ensaios de remoção de petróleo como se segue.

Cubas de vidro de 500 mL de capacidade foram preenchidas com 400 mL de água destilada e sobre a água foram dispensados cuidadosamente 1,5g de petróleo. Foram deixadas que as manchas de óleo se espalhassem por 30 minutos, após o que foram aplicados, com o auxílio de um borrifador acoplado a um compressor de ar, 50 mL de cada um dos géis de quitosana a serem testados. Após esse procedimento, os óleos de cada placa foram removidos com uma pá e a amostras de água filtradas sobre papel de filtro, previamente tarados. Os papéis foram postos para secar, depois foram pesados e analisados.

Experimentos com água e somente com células bacterianas, nas mesmas concentrações, foram feitos como controles.

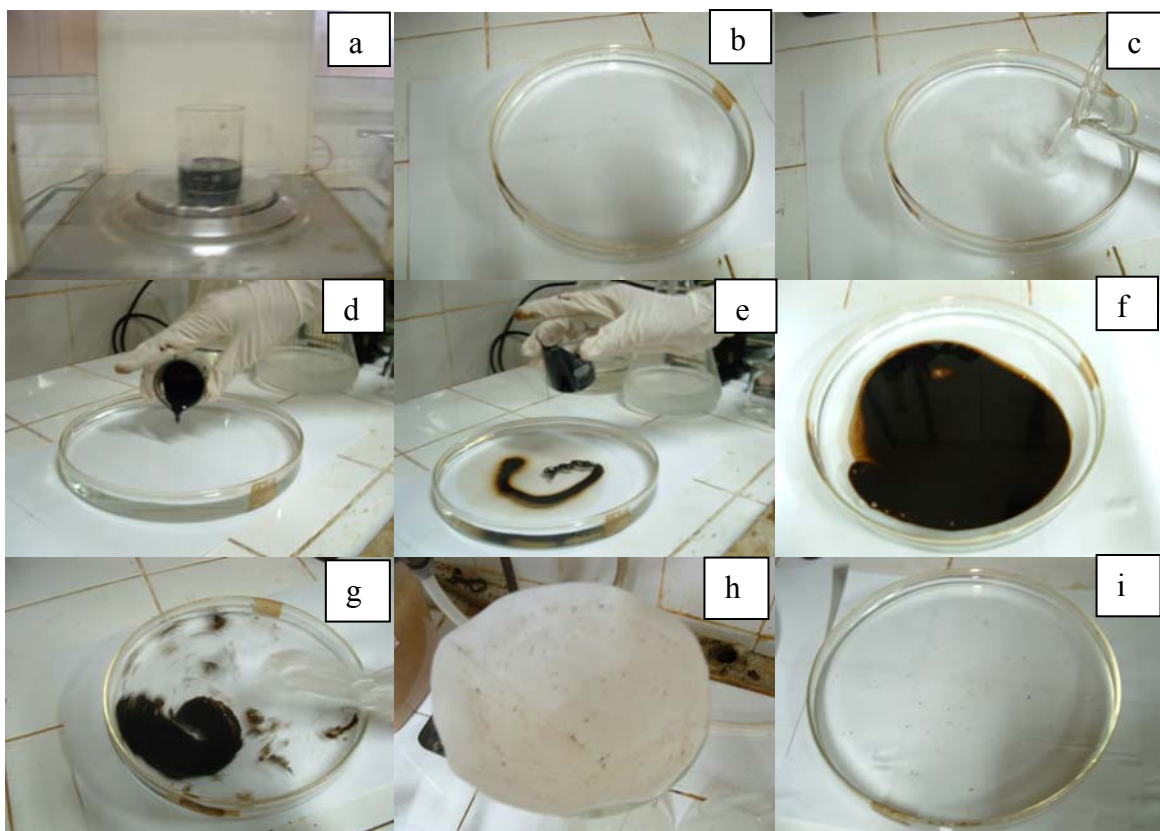


Figura 9: Seqüência do experimento de simulação de remoção de petróleo da água: a) Pesagem do petróleo, b) Placa de petri, c) Adição de água, d) Adição do petróleo; e) Adição do petróleo; f) Espalhamento da mancha g) Aplicação de solução, g) Filtro após remoção, h) Aspecto da superfície da água após a remoção do petróleo.

5. RESULTADOS

5.1. OBTENÇÃO DE QUITINA A PARTIR DE CARAPAÇAS DE CAMARÃO

O processo de obtenção de quitina a partir das carapaças do camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* apresentou um rendimento de 90,4%. A quitina obtida foi identificada por espectrometria de infravermelho (Figura 10).

A figura 10 mostra o espectro de absorção da quitina com as bandas características da amida nas regiões de 1659 cm^{-1} - estiramento C=O - conhecida como banda de amida I; 1559 cm^{-1} - deformação N-H - banda de amida II e 1315 cm^{-1} - atribuída à deformação CO-NH e ao grupo CH_2 , que acontece à mesma frequência. Essa última banda tem sido denominada banda de amida III, devido à deformação do grupo CO-NH. A banda aguda a 1379 cm^{-1} é atribuída à deformação simétrica do CH_3 . A banda em $3101,44\text{ cm}^{-1}$ é atribuída à vibração de estiramento N-H, e a observada a $3446,98\text{ cm}^{-1}$ ao estiramento O-H.

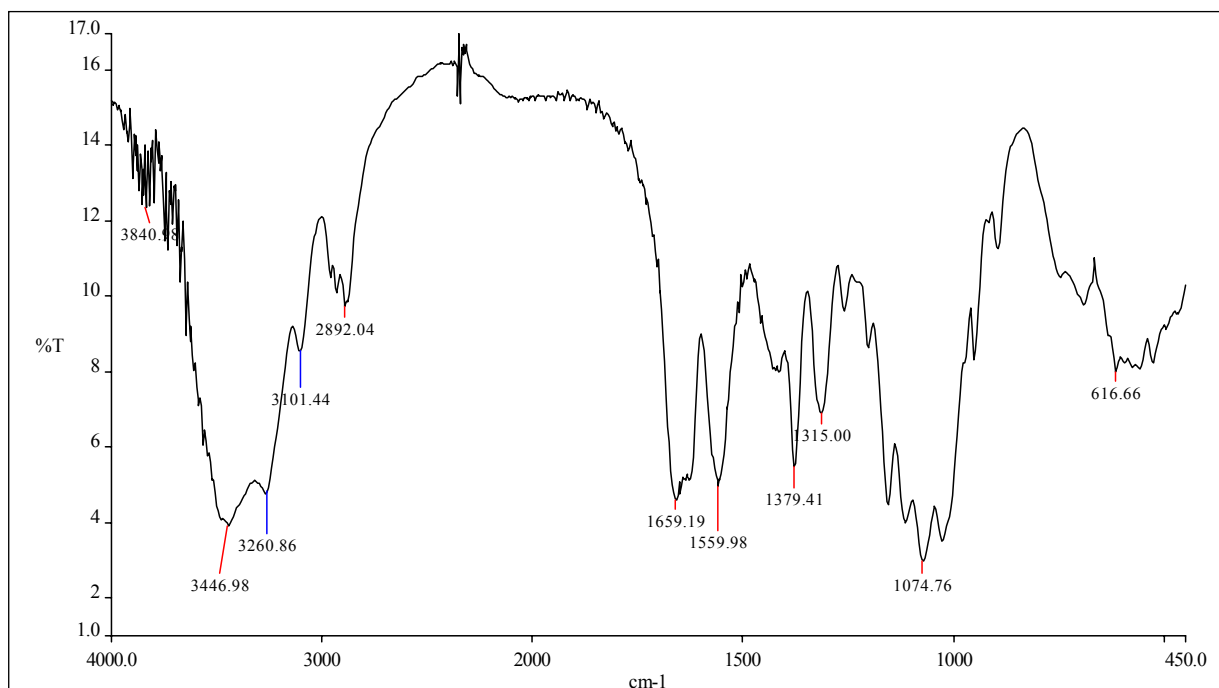


Figura 10: Espectro de absorção da quitina no infravermelho.

5.2. OBTENÇÃO DE QUITOSANA

A reação de desacetilação da quitina por hidrólise alcalina apresentou rendimento satisfatório de 73%. A quitosana obtida foi analisada e as características físico-químicas tais como, perdas por dessecação, resíduo de ignição, insolúveis e pH foram determinadas conforme técnicas convencionais. O grau de desacetilação foi determinado por titulometria e a viscosidade e peso molecular por viscosimetria. Os resultados são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Características físico-químicas da quitosana.

TESTE	RESULTADO
Perda por dessecação	7,2%
Resíduo de ignição	0,5%
Grau de Desacetilação	78%
Insolúveis	0,45%
Viscosidade	27 cps
Peso Molecular	117.000 Da
pH	7,8

A técnica de espectrometria de infravermelho é útil para comprovar a hidrólise dos grupamentos acetila da estrutura da quitina, através da redução da banda de estiramento da carbonila da amida. Dessa forma, a figura 11 mostra o espectro da quitosana obtida neste trabalho. Nesta figura observa-se as bandas em $2923,58\text{ cm}^{-1}$, atribuída ao estiramento C-H, em $1650,78\text{ cm}^{-1}$, conhecida com a banda de amida I ($\nu\text{ CO}$, δNH), devido aos grupos acetilados residuais da quitina, e em $1562,82\text{ cm}^{-1}$, correspondente à deformação N-H de aminas. A banda em $1377,29\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a deformação simétrica do CH_3 , enquanto que a banda larga entre $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ é atribuída a $\nu\text{ OH} + \nu\text{ NH}$.

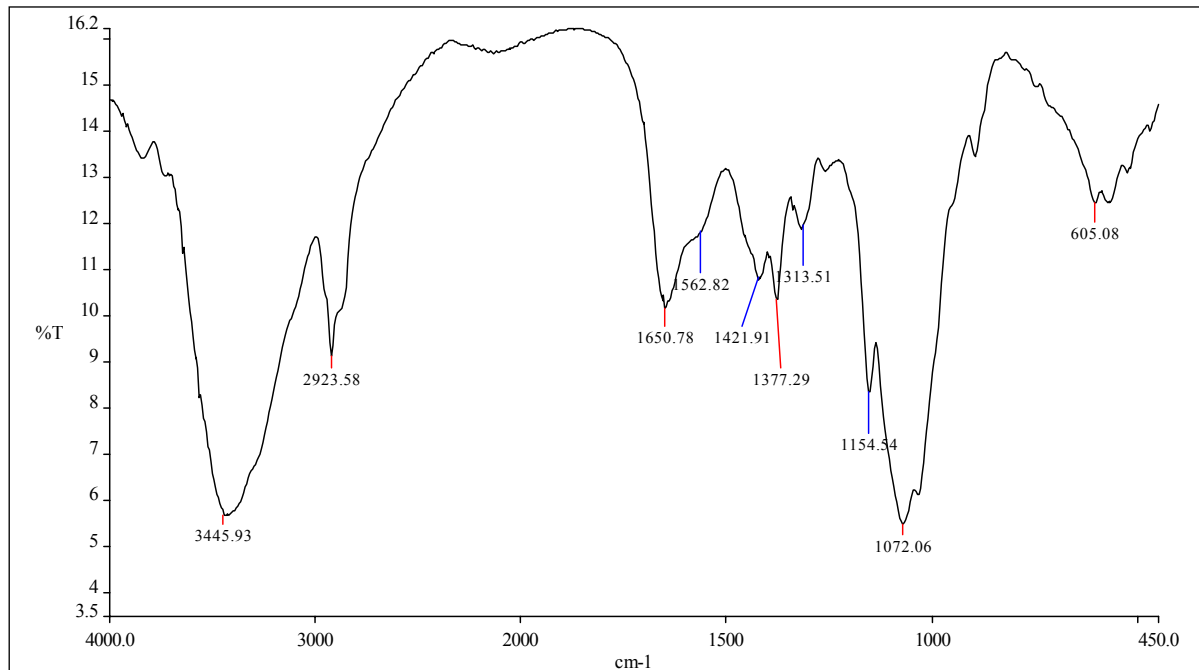


Figura 11: Espectro de absorção da quitosana no infravermelho.

5.3. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DA CEPA PFA 001 E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A cepa, PFA001, apresentou maior similaridade (99%) com o rDNA 16S de *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305, cuja seqüência completa do genoma está depositada no GenBank com número de acesso AP008934. O alinhamento entre as seqüências 16S da linhagem PFA001 e do *Staphylococcus saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305 é mostrado na figura 12.

- | | |
|-----|--|
| (1) | 11 ATACATGCA-GTCG-TGCGAACAGATA-GGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGG 68 |
| (2) | ATACATGCA-AGTCG-AGCGAACAGATA-AGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGG |
| (1) | 69 GTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTA 128 |
| (2) | GTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTA |
| (1) | 129 ATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTT 188 |
| (2) | ATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTT |

- (1) 189 ATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGAT 248
 |||
 (2) ATAGATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGAT
- (1) 249 ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCT 308
 |||
 (2) ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCT
- (1) 309 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGC 368
 |||
 (2) ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGC
- (1) 369 GTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAACGTGTAA 428
 |||
 (2) GTGAGTGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAACGTGTAA
- (1) 429 GTAAGTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA 488
 |||
 (2) GTAAGTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
- (1) 489 GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTA 548
 |||
 (2) GCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTA
- (1) 549 GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAAC 608
 |||
 (2) GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAAC
- (1) 609 TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAG 668
 |||
 (2) TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAG
- (1) 669 AGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTG 728
 |||
 (2) AGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTG
- (1) 729 CGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG 788
 |||
 (2) CGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG
- (1) 789 TGCTAAGTGTTAGGGGTTTCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC 848
 |||
 (2) TGCTAAGTGTTAGGGGTTTCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
- (1) 849 CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG 908
 |||
 (2) CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG
- (1) 909 TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTTGACATCCTTT 968
 |||
 (2) TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTTGACATCCTTT
- (1) 969 GAAAACCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTT 1028

```

(2)  |||
      GAAAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
(1)  1029 GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGC 1088
      |||
(2)  GTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGC

(1)  1089 TTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG 1148
      |||
(2)  TTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG

(1)  1149 GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATG 1208
      |||
(2)  GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATG
(1)  1209 GACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGT 1268
      |||
(2)  GACAATACAAAGGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGT

(1)  1269 TCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAG 1328
      |||
(2)  TCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAG

(1)  1329 CATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT 1388
      |||
(2)  CATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT

(1)  1389 TGTAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCATTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGGACAA 1448
      |||
(2)  TGTAACACCCGAAGCCGGTGGAGTAACCATTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGGACAA

(1)  1449 AT 1450
      ||
(2)  AT

```

Figura 12. Alinhamento entre as seqüências do rDNA 16S da linhagem PFA001 (1) e de *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* ATCC 15305. Essa última seqüência foi obtida do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Nucleotídeos conservados nas duas seqüências estão indicados por barras verticais.

5.4. IMOBILIZAÇÃO DA CEPA PFA001 EM ESFERAS DE QUITOSANA

A metodologia utilizada para a imobilização da biomassa bacteriana em quitosana apresentou-se bastante eficiente, pois o sistema de gotejamento controlado produziu esferas de excelente qualidade em termos de consistência e uniformidade, com 1-2 mm de diâmetro. (Figura 13).

As leituras de absorvância das soluções de NaOH durante todas as etapas de produção das esferas mostraram que não houve perda significativa de biomassa durante o procedimento de produção.



Figura 13. Medida da esfera de quitosana em mm.

As esferas produzidas na proporção 1:1 (m/m), quitosana: *Staphylococcus saprophyticus* se diferenciaram das esferas feitas apenas com quitosana pela coloração amarela, devido ao pigmento produzido pela bactéria (Figura 14).



Figura 14: Esferas de quitosana (A) e esferas de quitosana contendo células da bactéria *Staphylococcus saprophyticus* PFA001 immobilizadas na proporção 1:1 (m:m) quitosana: biomassa (B).

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que a quitosana em flocos, usada como matéria prima, possui uma superfície rugosa e fibrosa (Figura 15). A varredura das esferas de quitosana revelou uma superfície cheia de protuberâncias, algumas provavelmente originadas pela distribuição de pacotes de células no interior das esferas. Também se observam células aderidas à superfície (Figura 16). Não foram obtidas fotomicrografias com boa resolução do interior das esferas.

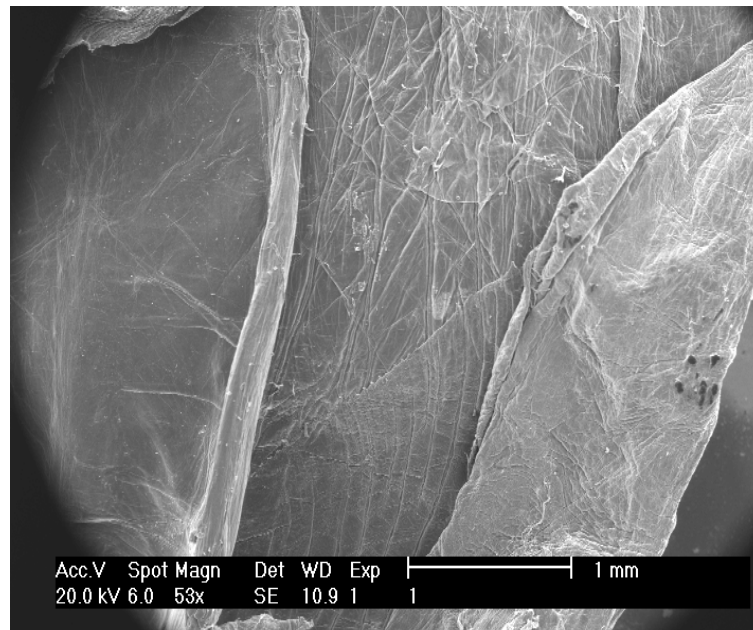


Figura 15: Aspecto superficial de um floco de quitosana como revelado por microscopia eletrônica de varredura.

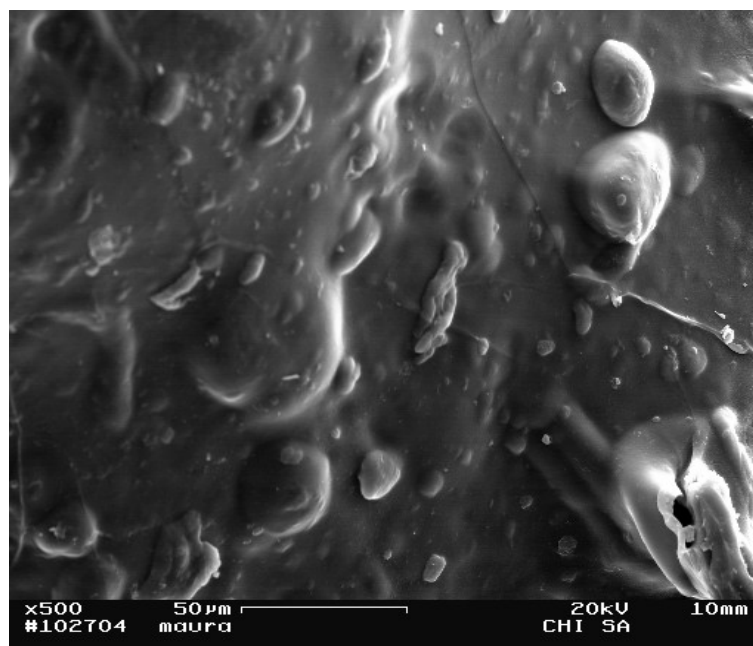


Figura 16: Aspecto superficial de uma esfera de quitosana com a bactéria *Staphylococcus saprophyticus* como revelado por microscopia eletrônica de varredura.

5.5. ATIVIDADE EMULSIFICANTE

As esferas de quitosana-bactéria na proporção 1:1 apresentaram maiores percentuais de emulsificação do que as preparadas na proporção 2:1 (m:m) de quitosana : bactéria (Figura 17). As esferas de quitosana sem células (controle) não apresentam atividade emulsificante comprovando que a emulsificação foi promovida exclusivamente pelas células. A emulsão manteve-se estável por mais de 12 meses.

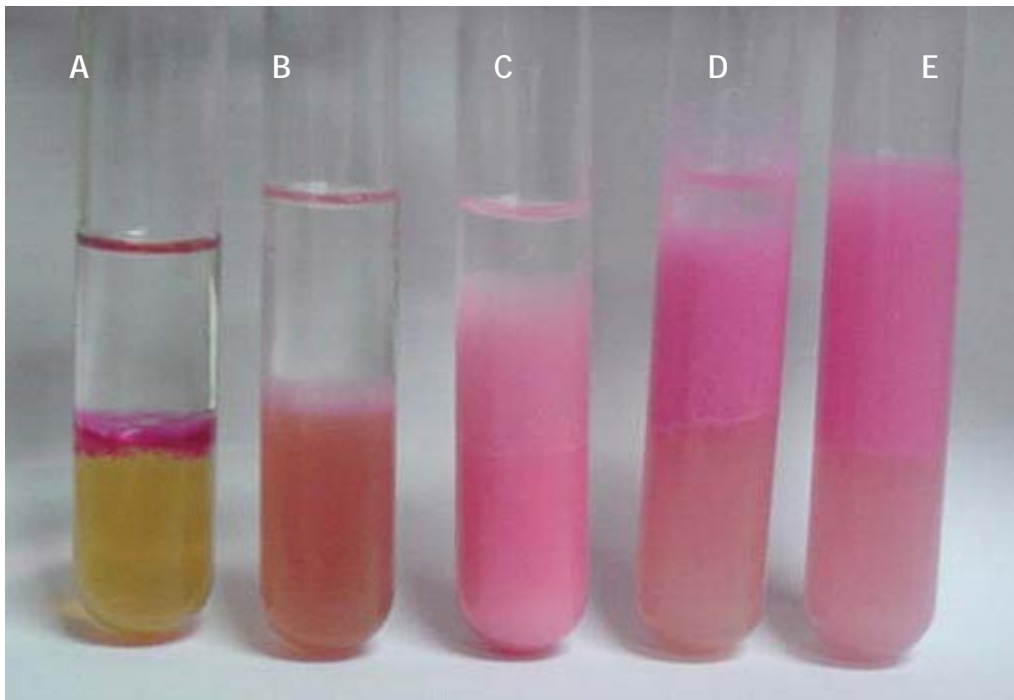


Figura 17: Aspecto da emulsificação de uma mistura querosene-água promovida por esferas de quitosana com a bactéria *Staphylococcus saprophyticus* imobilizada: A – QT sem agitação, B – QT com agitação, C – *S. saprophyticus*, D – QT_B (1:2), E – QT_B (1:1)

Os resultados da emulsificação do querosene pelas esferas de quitosana com a bactéria imobilizada na proporção 1:1 (quitosana:biomassa), secas por liofilização ou secas ao ar não apresentaram diferença significativa, ficando em torno de 60%.

5.6. PRODUÇÃO DE FILMES E MEMBRANAS DE QUITOSANA

As membranas e filmes de quitosana produzidos neste trabalho demonstram claramente que é possível produzir esses materiais com uniformidade. O maior cuidado deve ser dado à etapa de secagem dos materiais para evitar danos, formação de bolhas, ou

enrugamentos. A figura 18 mostra o aspecto de uma membrana de quitosana e de uma membrana de quitosana contendo células da bactéria *Staphylococcus saprophyticus* PFA001 imobilizadas na proporção 1:1 (m:m) quitosana: biomassa. Visualmente a membrana e o filme de quitosana são indistinguíveis, entretanto, ao tato, percebe-se que possuem texturas diferentes.

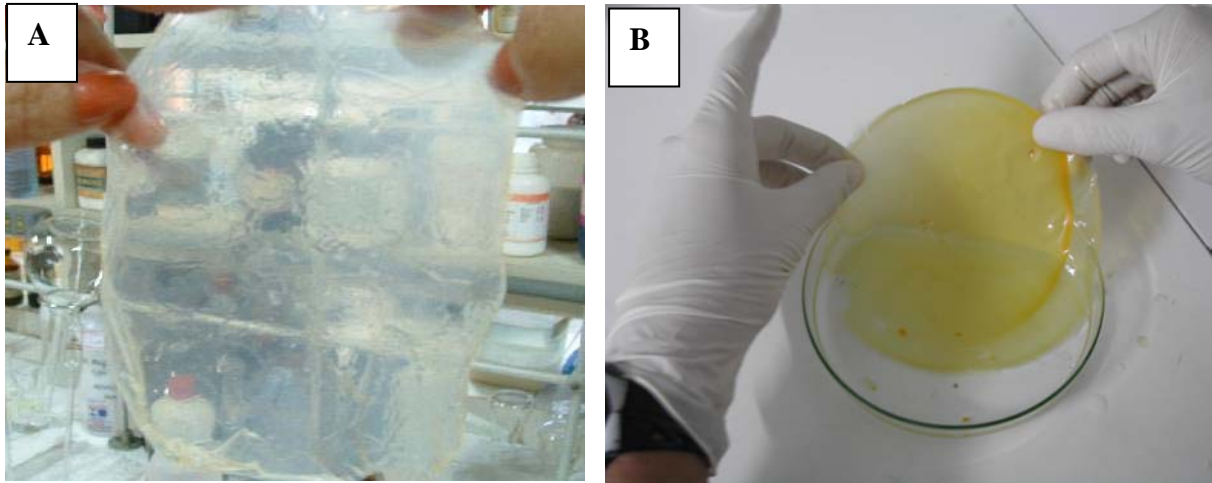


Figura 18: Membrana de quitosana. (A) e membrana de quitosana contendo células da bactéria *Staphylococcus saprophyticus* PFA001 imobilizadas na proporção 1:1 (m:m) quitosana: biomassa (B).

As membranas e filmes de quitosana sem e com bactérias imobilizadas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A figura 19 mostra os aspectos superficiais da membrana e filme de quitosana revelados por MEV. Como dito anteriormente, aparentemente, não se observam diferenças entre esses materiais. A figura 20 mostra detalhes das superfícies de membranas com células imobilizadas.

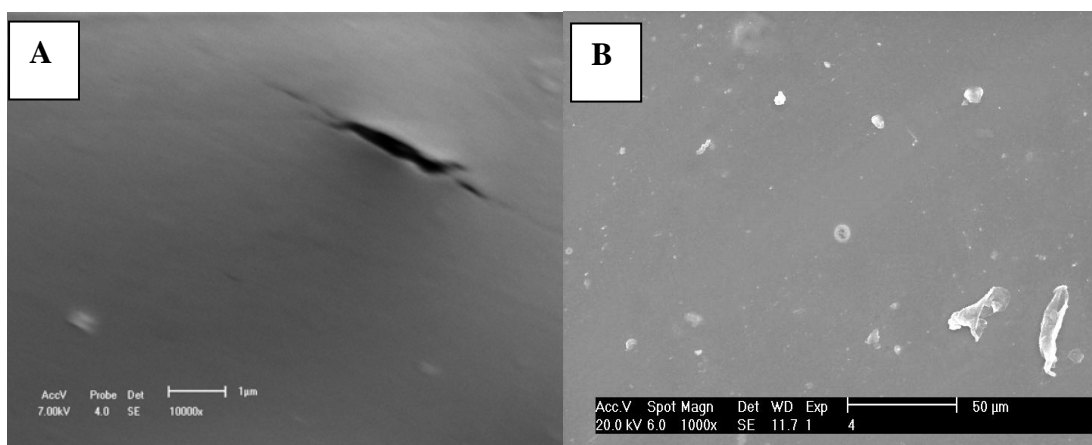


Figura 19: Aspecto superficial de membrana (A) e filme (B) de quitosana como revelado por microscopia eletrônica de varredura.

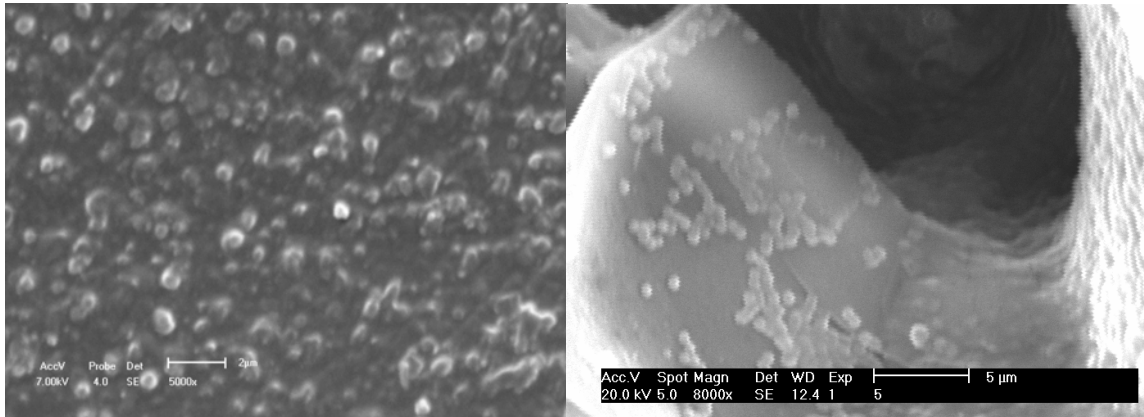


Figura 20: Aspectos de membranas de quitosana contendo células de *S. saprophyticus* imobilizadas como revelado por microscopia eletrônica de varredura.

As membranas também foram analisadas por espectrometria infravermelha e diferenças visíveis foram observadas entre os espectros de membranas sem e com bactérias imobilizadas, como mostrado nas figuras 21 e 22. Um conteúdo de água residual pode ser identificado pelo pico largo na região de 3500 a 2800 cm^{-1} . A principal diferença entre os espectros diz respeito ao pico a 1649 cm^{-1} , estiramento $\text{C}=\text{O}$ da amida, na membrana de quitosana que desapareceu na presença da bactéria. A faixa devido à deformação do CH_2 em 1466 cm^{-1} , foi alargada na membrana de quitosana e não apareceu quando na presença da bactéria. Essas diferenças provavelmente podem ser atribuídas a interferências causadas por polímeros da parede celular da bactéria.

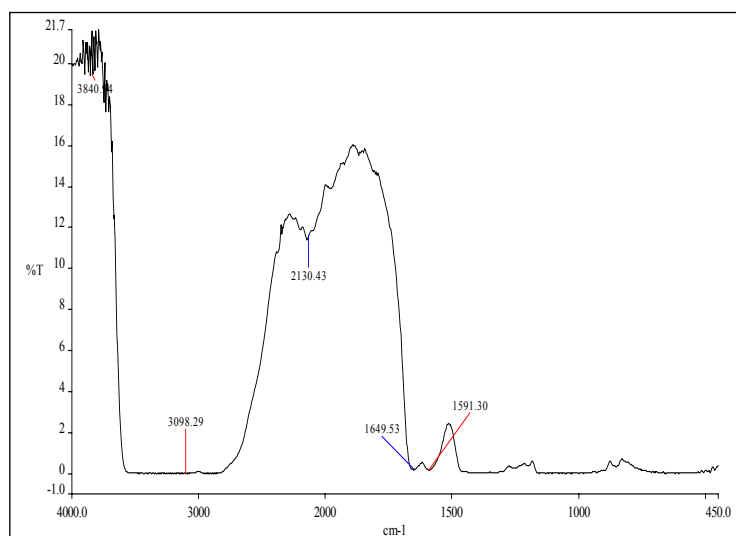


Figura 21: Espectro de absorção infravermelha de membrana de quitosana.

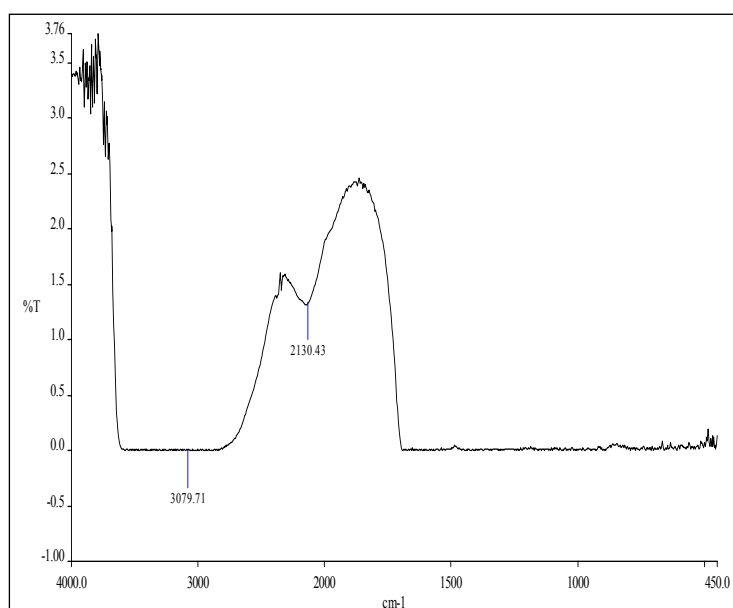


Figura 22: Espectro de absorção infravermelha de membrana de quitosana com células de *S. saprophyticus* imobilizadas.

5.7. TESTE DE SOLUBILIDADE DOS FILMES E MEMBRANAS EM pH 6

Os testes de solubilidade de filmes e membranas em pH 6 tiveram por finalidade avaliar perdas de massa devido à possível solubilização nesse pH. Os resultados mostraram que a perda de massa foi insignificante para os filmes e membranas testados, com um percentual de perda de $3,5\% \pm 0,057$.

5.8. PROPRIEDADES MECÂNICAS DE FILMES E MEMBRANAS DE QUITOSANA

As membranas e filmes foram submetidos a testes de tração para verificar suas resistências. Os valores de tensão de ruptura e módulo de Young estão mostrados na tabela 4. As membranas com a bactéria *S. saprophyticus* imobilizada apresentaram maiores valores de tensão de ruptura e de módulo de Young do que as membranas sem o microrganismo. Outro ponto a ser destacado é que as membranas apresentaram maiores valores de tensão de ruptura e módulo de Young do que os respectivos filmes. Provavelmente, o glicerol tornou os adsorventes mais maleáveis e flexíveis e, conseqüentemente, mais elásticos (maiores valores de elasticidade). A figura 23 mostra o aspecto da ruptura de uma membrana.

Tabela 4: Propriedades físicas de membranas e filmes de quitosana sem e com bactérias imobilizadas.

Amostra	Propriedades Físicas	
	Tensão de Ruptura (σ) (Mpa)	Módulo de elasticidade (E) (Mpa)
QT	$53,62 \pm 1,87$	$446,8 \pm 0,21$
QTB	$73,96 \pm 2,06$	$493,1 \pm 0,01$
QTG	$20,50 \pm 0,56$	$146,4 \pm 0,02$
QTGB	$8,91 \pm 1,14$	$222,8 \pm 0,01$



Figura 23: Aspecto do rompimento da membrana de quitosana com *S. saprophyticus* imobilizada.

5.9. ESTUDO DA ADSORÇÃO DE ÍONS Cu (II) E Pb (II) COM MEMBRANAS E FILMES DE QUITOSANA SEM E COM BACTÉRIAS IMOBILIZADAS

Para os estudos de adsorção em membranas foram adaptados sistemas de cartuchos (Figura 24). Primeiramente foram estudados os tempos de escoamento de cada solução de Cu(II) e Pb(II) pelas membranas na concentração de 88,52 ppm e 85,60 ppm respectivamente. Observou-se que houve o escoamento das soluções de Cu (II) e Pb (II) pelas membranas dentro dos cartuchos como mostra os resultados das tabelas 5 e 6. Foram coletados 5 mL das soluções que escoaram pelas membranas e o volume total que não escoaram pelos filmes. Foram determinados os tempos de escoamento para cada mililitro das soluções de Cu (II) e Pb (II). As soluções que não escoaram permaneceram em contato com os filmes dentro dos cartuchos por 24 horas para confirmar a impermeabilidades dos filmes. Pelos resultados é possível concluir que as membranas de quitosana são mais permeáveis do que as membranas com *S. saprophyticus* imobilizado, comprovando que o microrganismo aumenta o impedimento estérico na passagem dos íons metálicos.



Figura 24: Sistema de cartuchos com os filmes e membranas de quitosana para adsorção dos íons metálicos Cu (II) e Pb (II).

Tabela 5: Tempo de escoamento da solução de Cu (II) em membranas e filmes de quitosana.

Amostra	QT	QTB	QTG	QTGB
Volume				
	Tempo de escoamento (min)			
1 mL	9	13	0	0
2 mL	28	35	0	0
3 mL	60	90	0	0
4 mL	105	158	0	0
5 mL	165	300	0	0

Tabela 6: Tempo de escoamento da solução de Pb (II) em membranas e filmes de quitosana.

Amostra	QT	QTB	QTG	QTGB
Volume				
	Tempo de escoamento (min)			
1 mL	16	20	0	0
2 mL	45	59	0	0
3 mL	129	170	0	0
4 mL	219	344	0	0
5 mL	360	458	0	0

De acordo com o resultados da tabela 7 percebe-se as membranas de quitosana foram ligeiramente mais eficientes do que os filmes para adsorver Cu(II) e Pb (II). A incorporação da bactéria *S. saprophyticus* nesses materiais aumentou significativamente a capacidade desses materiais para adsorver esses metais, sendo as membranas ligeiramente mais eficientes do que os filmes. De maneira geral, foi adsorvido mais cobre do que chumbo pelos materiais.

Tabela 7: Capacidade de adsorção de Cu (II) e Pb (II) em membranas e filmes de quitosana

Amostra	Adsorção de Cu(II) mg/g	Adsorção de Pb (II) mg/g
QT	3,94	3,41
QTG	3,73	2,23
QTB	9,28	6,73
QTGB	8,43	5,47

A figura 25 mostra o aspecto de um filme de quitosana antes e depois da eluição de solução de Cu(II), onde é possível observar visualmente a adsorção do metal (cor azul).



Figura 25: Aspectos dos filmes de quitosana antes e após adsorção dos íons Cu (II).

5.10. REMOÇÃO DE Cu (II) E Pb (II) DE AMOSTRAS DE ÁGUAS CONTAMINADAS POR ESFERAS DE QUITOSANA COM E SEM BACTÉRIAS IMOBILIZADAS

De maneira geral as esferas de quitosana sem e com a bactéria imobilizada removeram de forma bastante eficiente cobre e chumbo de amostra de água marinha e de água potável (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8: Percentagem de remoção de Cu(II) de amostras de água por esferas de quitosana com e sem a bactéria PFA001 imobilizada.

Adsorvente	Tipo de água	Concentração (ppm)	Remoção (%)
QT	Marinha	20	89
	Potável	20	92
QTB	Marinha	200	94
	Potável	200	92

Tabela 9: Percentagem de remoção de Pb (II) de amostras de água por esferas de quitosana com e sem a bactéria PFA001 imobilizada.

Adsorvente	Tipo de água	Concentração (ppm)	Remoção (%)
QT	Marinha	20	88
	Potável	20	93
QTB	Marinha	200	78
	Potável	200	83

5.11. ESTUDO DA ADSORÇÃO DE Cu (II) E Pb (II) EM LEITO FIXO

As medidas das capacidades de adsorção de cobre e chumbo por grama de esfera de quitosana mostraram que foram adsorvidos mais de 20 mg por grama de quitosana das esferas e que não houve diferença significativa entre a performance das esferas na adsorção dos íons metálicos (Tabela 10).

Tabela 10: Capacidade de adsorção de Cu (II) e Pb (II) por esferas de quitosana com e sem bactéria imobilizada.

Adsorvente	Adsorção de Cu (II) mg/g	Adsorção de Pb (II) (mg/g)
QT	24,35	21,24
QTB	25,15	26,95

5.12 EFICIÊNCIA DA DESSORÇÃO DE METAIS TRAÇOS

O estudo de dessorção permitiu elucidar o processo de adsorção e a recuperação dos íons metálicos dos adsorventes (Tabela 11). Também permitiu verificar a eficiência do processo de regeneração do material. Dentre os vários eluentes recomendados pela literatura para recuperação de íons metálicos de matrizes aquosas foi utilizado o EDTA 1M, uma vez que as esferas não são reticuladas, portanto dependem da condição do pH da solução. Como pode ser observado foram recuperados mais de 90% de cobre e mais de 80% de chumbo das esferas, independentemente da presença de bactérias.

Tabela 11: Eficiência da remoção (dessorção) de Cu (II) e Pb (II) das esferas de quitosana com e sem a bactéria *S. saprophyticus* imobilizada.

Adsorvente	Dessorção de Cu (II) (%)	Dessorção de Pb (II) (%)
QT	92,4 ± 1,48	88,3 ± 1,00
QTB	93,1 ± 1,10	82,2 ± 1,37

5.13. ESTUDO DA ADSORÇÃO DE Cu (II) E Pb (II) EM BATELADA

5.13.1. Isoterma de adsorção em sistema de batelada

As concentrações e o tempo de contato utilizado na adsorção dos íons metálicos no sistema estático (batelada) foram suficientes para atingir o equilíbrio da reação (Figura 26). A capacidade de adsorção dos íons metálicos nos adsorventes foi estudada em pH = 6.



Figura 26: Remoção de Cu (II) e Pb (II) de esferas de quitosana em sistema em batelada.

Os resultados experimentais e teóricos obtidos para as capacidades de adsorção dos íons (Cu(II) e Pb(II)) pelas esferas de QT e QTB usando os modelos de Lagmuir e Freundlich demonstraram que o modelo de Lagmuir melhor descreve o mecanismo de adsorção de Cu(II) pelas esferas de QT e QTB e o modelo de Freundlich descreve melhor o modelo de adsorção de Pb(II) pelas esferas de QT e QTB indicando neste caso, heterogeneidade na adsorção do metal na superfície desse material (Figuras 27-30).

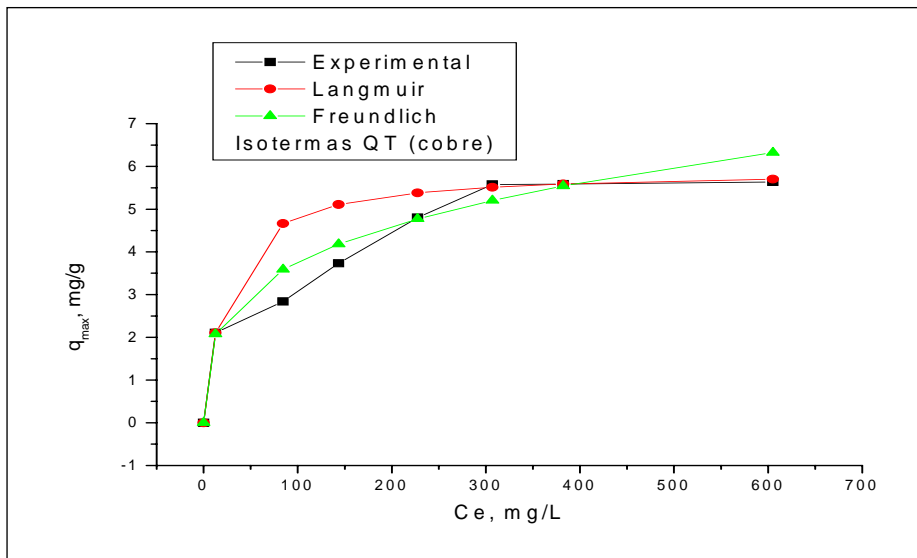


Figura 27: Adsorção experimental de Cu (II) em esferas de quitosana.

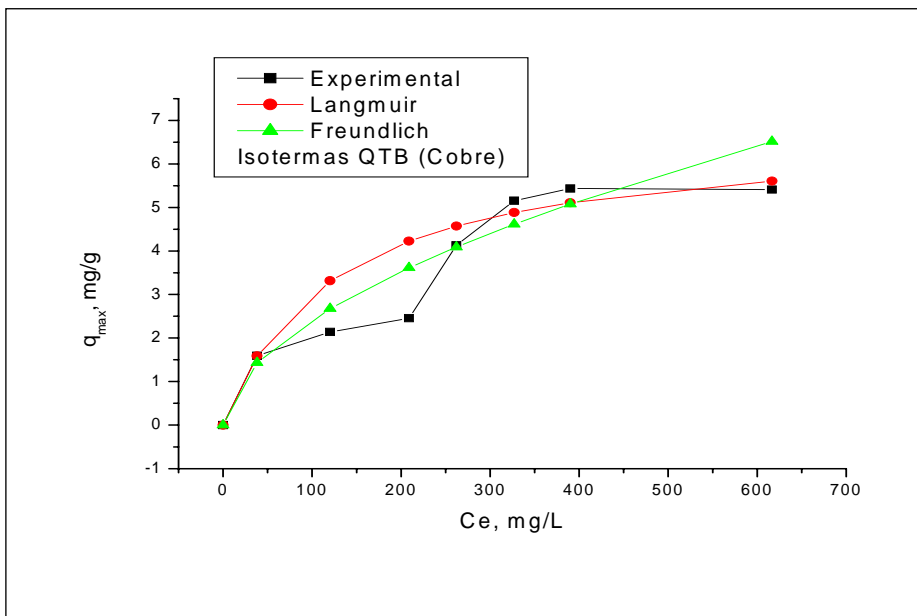


Figura 28: Adsorção experimental de Cu (II) em esferas de quitosana contendo células de *S. saprophyticus* imobilizadas.

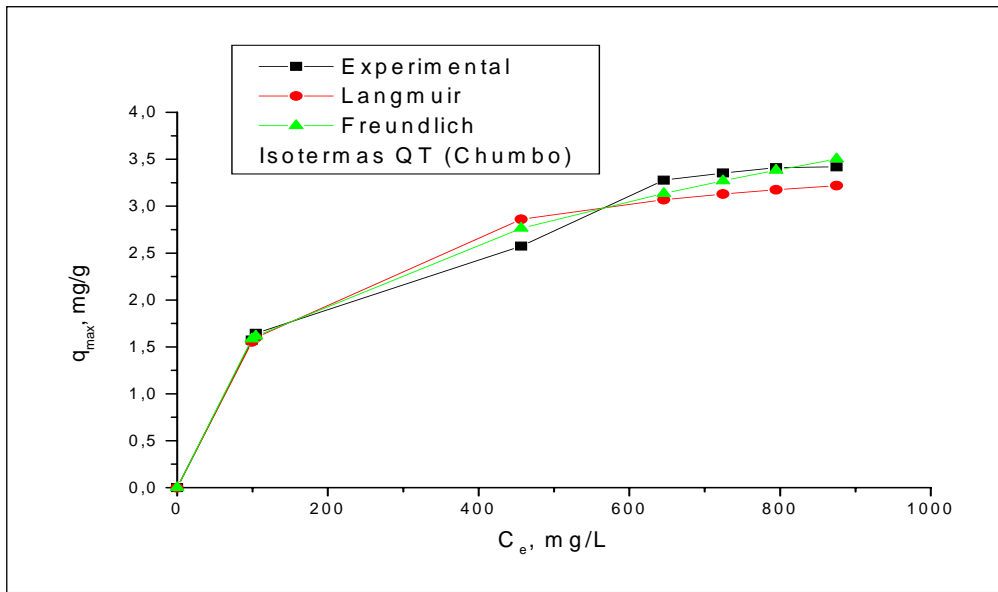


Figura 29: Adsorção experimental de Pb (II) em esferas de quitosana.

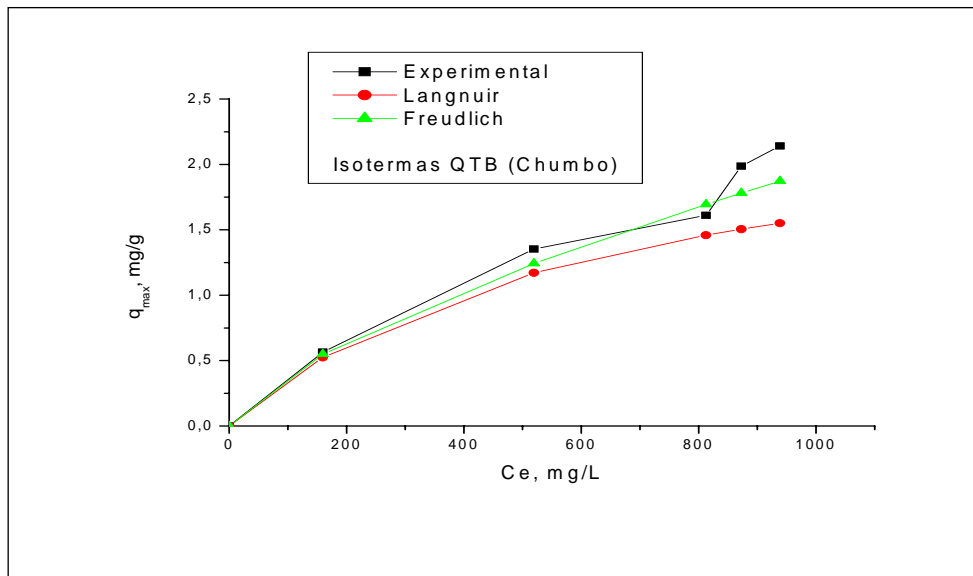


Figura 30: Adsorção experimental de Pb (II) em esferas de quitosana contendo células de *S. saprophyticus* imobilizadas.

Os valores de $1/n$ e P da equação de Freundlich representam a intensidade e a capacidade de adsorção do adsorvente. Estes termos ($1/n$ e P) foram obtidos por regressão linear e estão listados nas tabelas 12 e 13. Os dados indicam que as esferas de QT e QTB adsorvem cobre igualmente. Estes resultados são interessantes do ponto de vista de uso prático. Como exemplo temos a possibilidade do uso como fase estacionária para colunas comerciais visando a extração e/ou pré-concentração de metais pesados em sistema aquáticos, alimentos etc, como também podem servir de recheio de filtros para remoção dos referidos metais de águas de dejetos industriais. As esferas de QT e QTB produzidas apresentaram-se uniformes, resistentes e facilmente compactadas nas colunas.

Tabela 12: Parâmetros de ajuste dos resultados em sistema de batelada das isothermas realizadas com QT e coeficientes de correlação (r).

Metal	modelo Langmuir			modelo Freundlich		
	K	Q_{max} (mg/g)	R	P	$1/n$	R
Cu(II)	0,0440	5,9185	0,9999	1,003	0,2875	0,9955
Pb(II)	0,0072	3,7282	0,9897	0,2971	0,3642	0,99406

Tabela 13: Parâmetros de ajuste dos resultados em sistema de batelada das isothermas realizadas com QTB e coeficiente de correlação (r).

Metal	modelo Langmuir			modelo Freundlich		
	K	Q_{max} (mg/g)	R	P	$1/n$	R
Cu(II)	0,0081	6,7317	0,9970	0,1975	0,5442	0,9589
Pb(II)	0,0016	2,5837	0,9966	0,0164	0,6923	0,9637

5.13. SIMULAÇÃO DE REMOÇÃO DE PETRÓLEO POR HIDROGÉIS DE QUITOSANA SEM E COM A BACTÉRIA *S. saprophyticus* IMOBILIZADA

Na simulação de remoção de petróleo por hidrogéis de quitosana sem e com bactérias imobilizadas observou-se inicialmente que o petróleo se espalha diferentemente na superfície da água marinha e da água destilada, provavelmente devido às diferenças de densidade.

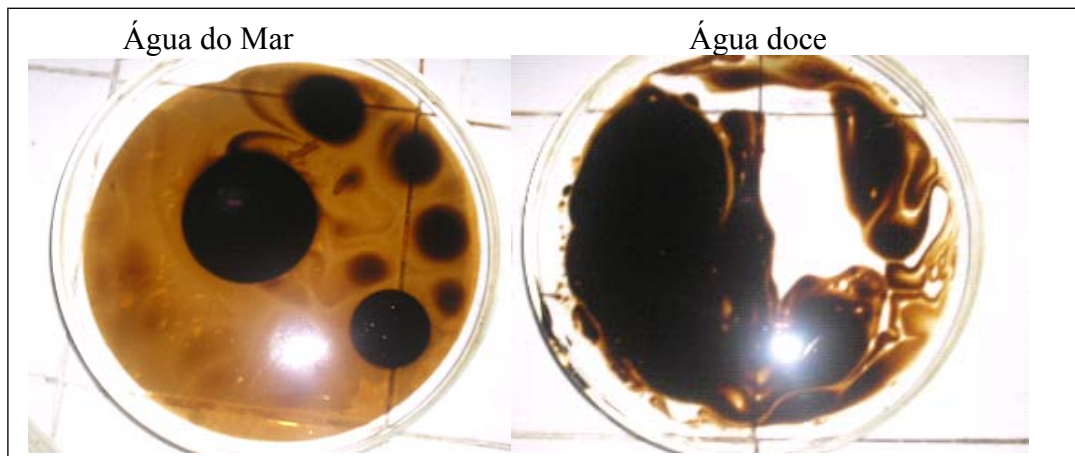


Figura 31: Aspecto do espalhamento de petróleo em uma amostra de água do mar e de água destilada.

Além disso, não foram observadas diferenças entre os percentuais de remoção de petróleo pelo hidrogel de quitosana e solução de bactérias. Nesse caso há de ser analisado os custos benéficos desses produtos. A tabela 14 mostra os percentuais de remoção de petróleo pelos hidrogéis.

Tabela 14: Percentuais de remoção de petróleo de amostras de água do mar e água destilada por hidrogéis de quitosana sem e com células de *S. saprophyticus* imobilizadas.

Solução	% de remoção de petróleo	
	Água doce	Água do mar
Água (controle)	48 ± 2,00	51 ± 2,08
Hidrogel de quitosana	90 ± 1,53	89 ± 1,53
Hidrogel de quitosana com <i>S. saprophyticus</i>	77 ± 1,15	80 ± 1,50
Solução de <i>S. saprophyticus</i>	88 ± 1,45	91 ± 1,22

A figura 32 mostra em detalhe o aspecto da mancha de petróleo após adição da solução de quitosana. Pode ser observado o agrupamento do óleo através da capacidade lipofílica do polímero.

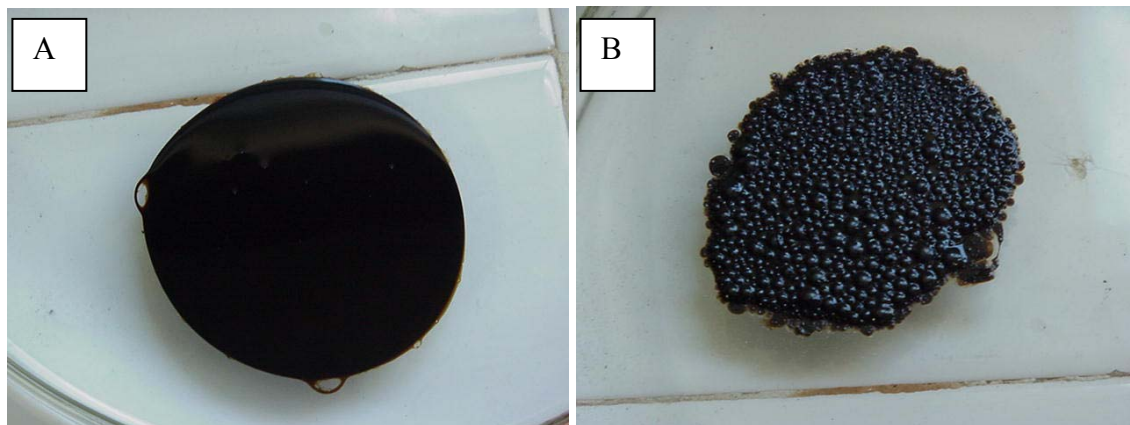


Figura 32: Aspecto de uma amostra de petróleo antes (A) e após adição de solução de quitosana (B).

6. DISCUSSÃO

A biorremediação é considerada uma tecnologia economicamente viável e ecologicamente correta. Entretanto, sua utilização no Brasil ainda encontra-se aquém de suas potencialidades. Isso possivelmente se deve ao fato de que qualquer tentativa de aplicação de biorremediação *in situ* deve começar conhecendo a comunidade microbiana indígena e as condições ambientais prevalentes na área contaminada. Outro problema recorrente diz respeito à toxicidade dos poluentes a serem tratados. Uma alternativa para esse problema é a utilização de microrganismos imobilizados. Nessa forma os microrganismos ficam protegidos contra a ação tóxica direta dos poluentes, sendo mais eficazes do que quando usados como células livres. Isso aumenta enormemente o número de microrganismos que pode vir a ser usado em biorremediação. Além disso, a utilização de microrganismos imobilizados minimiza os impactos causados pela introdução de microrganismos no ambiente, prática bastante restrita e protegida rigorosamente por lei.

Condizente com a ecologia contemporânea que procura cada vez mais por tecnologias limpas, focalizadas na utilização de produtos naturais e biodegradáveis, optou-se neste trabalho pelo uso de um suporte natural para a imobilização de bactérias. A escolha do suporte levou em consideração a natureza da matéria-prima, sua origem, a biodegradabilidade, o tipo de microrganismo a ser imobilizado, o processo de imobilização, a resistência dos materiais, o tipo de produto a ser desenvolvido, as aplicações, a reciclagem e a viabilidade econômica.

6.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA

Como suporte para imobilização foi escolhida a quitosana, um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina. A quitina, por sua vez, é um dos subprodutos da carcinicultura, um dos constituintes da carapaça de camarões. Essa escolha levou em conta o fato da carcinicultura brasileira e, particularmente, a do nordeste, ser uma atividade em franca expansão, com uma produtividade média (6,084 kg por hectare/ano) superior a da China e Tailândia, que são os dois maiores carcinicultores mundiais (ROCHA, 1998; RODRIGUES, 2003). Além da farta disponibilidade da matéria prima, o aproveitamento de resíduos da carcinicultura deve ser visto como uma atividade de reciclagem extremamente benéfica, haja vista que minimiza o impacto de toneladas de carapaças de camarão que sem utilidade são

fatalmente descartadas no ambiente, geralmente em zonas costeiras fragilizadas como as áreas de manguezais, causando sério impacto.

O processo químico de obtenção da quitina é bastante conhecido e envolve o tratamento dos resíduos de camarão com ácido e álcali. Nessas etapas podem ser recuperados outros produtos importantes tais como carbonato de cálcio, proteínas e o pigmento astaxantina, que fazem parte da constituição da carapaça do camarão. Conforme a literatura o camarão possui em média 10% a 20% de quitina (WESKA et al., 2005) e o tratamento pode recuperar mais de 90% desse polímero, o que de fato foi obtido neste trabalho. A confirmação da pureza da quitina foi feita através de análise das bandas de absorção características no infravermelho (CANELLA; GARCIA, 2001) e comparada com espectros de quitinas comerciais.

O método utilizado para obtenção de quitosana foi o mesmo utilizado industrialmente, onde a desacetilação da quitina é feita em solução aquosa de hidróxido de sódio. Vale ser ressaltado que a metodologia de desacetilação deve ser executada sob condições maximamente controladas, a fim de garantir um produto com características desejáveis. Dentre os fatores que podem comprometer o tipo de quitosana estão: a) temperatura e tempo de reação; b) a concentração da solução de álcali e adição de diluente (álcoois de cadeia curta e cetonas, por exemplos); c) razão quitina/álcali; d) tamanho das partículas de quitina; e) atmosfera da reação e f) presença de agentes que evitem a despolimerização (GOOSEN, 1997; NO; MEYERS, 1997). Segundo Rodrigues (2003) o método mais empregado de preparação de quitosana envolve a reação de desacetilação da quitina com NaOH 40% à 120°C durante cerca de 3 horas. Para se produzir 1 Kg de quitosana com grau de desacetilação de 70% são necessários 6,3 Kg de HCl, 1,8 Kg de NaOH e aproximadamente 1400 L de água.

As propriedades físicas e químicas da quitina e de seus derivados N-desacetilados (quitosana) são muito diferentes. Quitosana comercial possui, geralmente, grau de desacetilação (GD) variando de 70 a 95%, com massa molar na faixa de 10^4 - 10^6 g.mol⁻¹. Como muitas das propriedades destes polissacarídeos estão intimamente relacionadas a estes dois parâmetros, torna-se imprescindível a determinação dos mesmos.

A caracterização físico-química revelou que a quitosana utilizada neste trabalho tem 117.000 Da de massa e 78% de desacetilação.

Embora quitina e quitosana apresentem aspectos comuns de absorção no infravermelho, esses dois polissacarídeos podem ser distinguidos pelo conteúdo de grupos

acetamida principalmente nas regiões de 3700 cm^{-1} - 3000 cm^{-1} ; 3000 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} ; e 1800 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} (Figuras 10 e 11). Essas diferenças não se devem somente as diferentes estruturas primárias de quitina e quitosana com respeito ao teor de grupos acetamida, mas também à ocorrência de um empacotamento mais ordenado na quitina. Assim, o pequeno ombro em torno de 3380 cm^{-1} no espectro de quitina, e que não é observado no espectro de quitosana, pode ser atribuído às ligações de hidrogênio intramoleculares envolvendo o grupo O-H ligado ao carbono da posição 6 do anel de glicopirranose e o grupo C=O das acetamidas (FOCHER et al., 1992). As bandas em torno de 3260 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} no espectro de quitina, e que não são observadas no espectro de quitosana, podem ser atribuídas aos grupos N-H da acetamida em ligações intermoleculares de hidrogênio. Na região de deformação axial de C-H, correspondente ao intervalo 3000 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} , o espectro de quitina apresenta bandas mais intensas, e em maior número do que observado no espectro de quitosana, devido ao elevado teor de acetamidas. No intervalo 1800 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} , no qual são observadas as bandas denominadas de amida I e de amida II, os espectros de quitina e de quitosana são muito diferentes. No espectro de quitina, podem ser observados dois sinais de intensidades semelhantes, próximos de 1657 cm^{-1} e de 1560 cm^{-1} , correspondentes à banda de amida I. O desdobramento da banda de amida I, como observado no espectro de quitina, é associado com interações intermoleculares e a primeira banda é atribuída às ligações hidrogênio de grupos C=O e grupos N-H, enquanto que a banda centrada em 1560 cm^{-1} é atribuída às ligações de hidrogênio envolvendo grupos C=O, N-H e O-H ligado ao carbono da posição 6 do anel de glicopirranose (FOCHER et al., 1992). A banda de amida I é menos intensa nos espectros de quitosana e o seu desdobramento não é observado nesses casos. Além disso, a banda de amida II, centrada em 1560 cm^{-1} , é menos intensa nos espectros de quitosana, como consequência do acentuado processo de hidrólise dos grupos acetamida de quitina.

6.2. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DA CEPA PFA 001 E IMOBILIZAÇÃO EM QUITOSANA

A cepa de bactéria PFA001 foi previamente isolada de uma amostra de petróleo e encontra-se depositada na Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biologia da UFC. Os estudos das características culturais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas revelaram tratar-se de uma bactéria esférica (coco), com arranjo do tipo estafilococo, Gram positivo, pertencente ao gênero *Staphylococcus*

(GOMES, 2004). Estudos preliminares identificaram-na como *Staphylococcus aureus*, uma espécie patogênica para o homem. Subseqüentemente, a identificação molecular, entretanto, mostrou que esta cepa possui 99% de similaridade com a espécie *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, uma espécie saprófita, não patogênica, de ocorrência comum no ambiente. Esse resultado foi muito importante para dar prosseguimento aos testes de imobilização dessa bactéria em quitosana e utilização em biorremediação.

Essa cepa possui uma parede celular bastante hidrofóbica o que justifica a sua exploração como biossurfactante (GOMES, 2004). De fato, foram os resultados de emulsificação de vários hidrocarbonetos que estimularam a imobilização dessa bactéria em quitosana para emulsificação de misturas oleosas.

O primeiro problema a ser enfrentado no desenvolvimento de esferas de quitosana com a bactéria imobilizada foi a padronização das esferas. Para obter-se esferas padronizadas é importante padronizar primeiro as densidades das soluções de quitosana e da solução coagulante (solução de NaOH). As densidades dessas soluções se relacionam diretamente com suas concentrações, e controlam a formação e formato das esferas. Quando a solução coagulante apresenta uma densidade maior que a da solução de quitosana, as gotas de quitosana são deformadas com o choque da queda na superfície da solução alcalina e coagulam no formato de discos. Quando a solução de quitosana apresenta maior densidade que a do coagulante, pode ocorrer uma demora significativa na neutralização do ácido presente nas gotas, aumentando a possibilidade de coagularem unidas ao entrarem em contato entre si, formando “colares”, ou de se romperem ao se chocarem nas paredes do sistema ou na haste do agitador e perderem seu formato esférico. Quando as soluções apresentam densidades aproximadamente iguais, as gotas de solução de quitosana não encontram resistência suficiente para se deformarem e coagulam rapidamente, mantendo a forma esférica.

A velocidade de agitação, o volume da solução coagulante e a altura adequada entre o gotejador e o coagulante contribuem para que as gotas de quitosana coagulem isoladamente, ao invés de aglomerados de esferas que são impossíveis de separar sem danificar seu formato esférico.

A produção de esferas de quitosana com a cepa PFA001 imobilizada foi feita em um sistema otimizado com solução de quitosana a 4% fornecido a um fluxo controlado por uma bomba peristáltica de 4,0 mL/min, fluxo de ar comprimido usado na formação das gotas de

solução de 10,0 L/min, altura de aproximadamente 4,0 cm entre o gotejador e a solução alcalina, e velocidade de agitação de cerca de 12,0 rotações por minuto. Madhally e Mathew (1999) demonstraram que soluções de quitosana mais concentradas produzem poros menores e que a temperatura de congelamento, antes da liofilização, também influencia no tamanho dos poros. A concentração de 4% de quitosana foi considerada por estes autores, como uma concentração ideal para produção de esferas com poros bastante pequenos. A forma de secagem das esferas também interfere no tamanho dos poros e na ultraestrutura.

Costa (2006) descreveu que esferas de quitosana secas a 30 °C apresentam uma ultraestrutura bastante homogênea. Costa (2006) também avaliou o efeito da liofilização sobre a estrutura de esferas de quitosana e concluiu a partir de estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que esferas liofilizadas após congelamento a -20 °C apresentam superfície irregular, embora esferas liofilizadas após congelamento com nitrogênio líquido mostrem uma superfície ainda mais heterogênea, muito enrugada e bastante irregular. Assim, neste trabalho optou-se pela secagem a 30 °C.

A imobilização da bactéria *S. saprophyticus* em esferas de quitosana foi facilmente evidenciada pela coloração amarela das esferas, devido ao pigmento produzido por esta bactéria. Foram produzidas esferas bem homogêneas em termos de tamanho e formato. A verificação da imobilização por MEV mostrou uma superfície cheia de protuberâncias, que provavelmente se devem a cachos de bactérias, que são arranjos típicos dessa espécie. Não foram obtidas fotos de resolução de cortes do interior das esferas.

6.3. TIPOS DE APLICAÇÕES DE ESFERAS DE QUITOSANA

As esferas de quitosana (QT) e esferas de quitosana com a bactéria PFA001 imobilizada na proporção 1:1 (QTB) mostraram diferentes potenciais de aplicações. Embora as propriedades lipofílicas da quitosana sejam amplamente reconhecidas, (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999), esferas de quitosana não demonstraram nenhuma atividade emulsificante. Por outro lado, QTBs mostraram uma significativa atividade emulsificante (60%), promovendo a emulsificação do tipo óleo-água com diferentes hidrocarbonetos. Segundo Costa (2006), atividades de emulsificação acima de 40% já são suficientes para encorajar a pesquisa por biossurfactantes. Esses resultados mostram que QTBs podem ser usadas, por exemplo, em biorreatores industriais como coadjuvantes na emulsificação de misturas oleosas.

QTs e QTBs também foram testadas para a verificação dos seus potenciais de aplicação na remoção de íons metálicos de amostras de água doce e água do mar. Essas esferas se mostraram muito eficientes para a remoção de cobre e chumbo, removendo mais de 80% desses íons de amostras de água contaminadas com até 200µg/g. A capacidade de adsorção das esferas de QT e QTB foi da ordem de 20 mg de íons/g adsorvente, o que pode ser considerado uma excelente absorção. Não foi observada diferença significativa entre as QTs e QTBs para essas atividades. Portanto para essas finalidades teria que ser avaliado os custos/benefícios desses produtos. As QTBs, entretanto, por terem 50% de seu peso em biomassa de bactérias se tornam mais biodegradáveis do que as QTs, o que poderia justificar sua escolha.

Os estudos de dessorção de cobre e chumbo mostraram que esses íons foram facilmente removidos das esferas de QT e QTBs com EDTA, sendo recuperado mais de 90% de cobre e mais de 80% de chumbo, o que demonstra que esses íons interagem de forma fraca com esses materiais, além de apontar para a possibilidade de reutilização das esferas, o que é bastante interessante para fins comerciais.

6.4. EFEITO DO pH NA ADSORÇÃO DE Cu (II) E Pb(II)

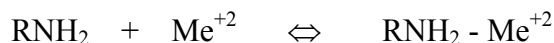
Os estudos das capacidades de adsorção de cobre e chumbo foram feitos em pH 6,0, o mais próximo da neutralidade, garantindo que as esferas não seriam dissolvidas e nem que os metais precipitassem. De maneira geral, a adsorção de metais pesados em quitosana aumenta com o aumento do pH das soluções. Em pH muito baixo, os grupos aminos da quitosana são protonados a NH^{3+} , ocasionando uma repulsão eletrostática dos íons metálicos e diminuindo a capacidade de adsorção. No entanto, em soluções com pH elevado ocorre simultaneamente o processo de formação dos hidróxidos dos íons metálicos. Contudo, em pH entre 3-6 ocorre adsorção do metal pelo adsorvente (AMORIM, 2002).

As reações descritas abaixo caracterizam estes processos de equilíbrio.

Protonação:



Formação do complexo:



O mecanismo de protonação da quitosana e a consequente interação deste polímero com o íon metálico segue um processo de quelatação como a proposta mostrada na figura 33.

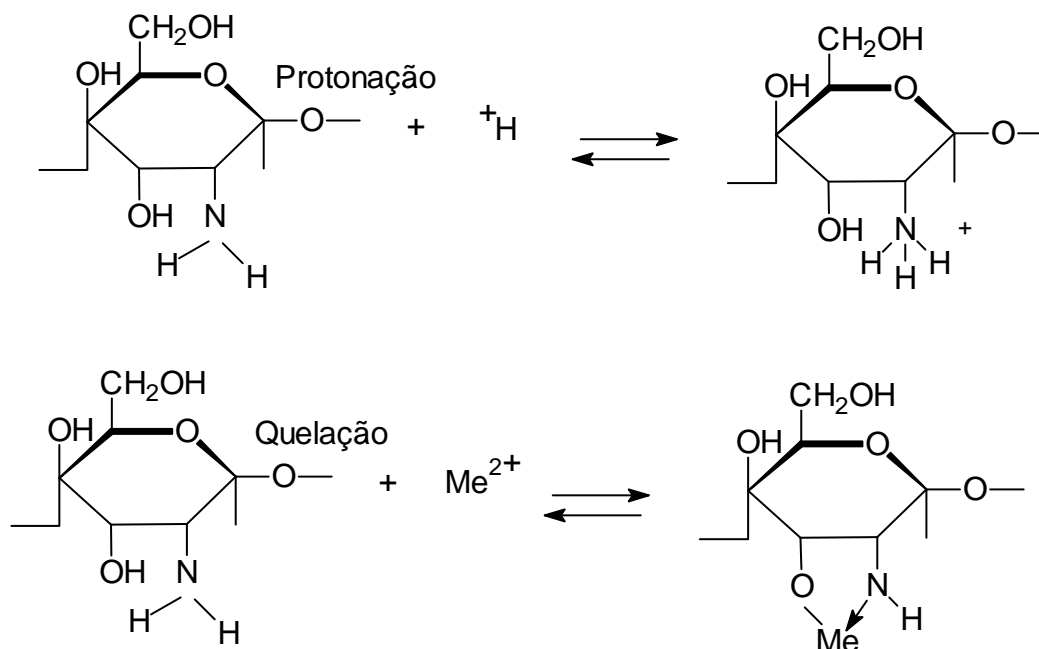


Figura 33. Mecanismo de adsorção do íon metálico no polímero quelante.

6.5. ADRÇÃO DE Cu (II) E Pb (II) EM LEITO FIXO

Quitina, quitosana e derivados são considerados materiais porosos. Durante o processo de adsorção dos íons em solução pelos poros do adsorvente existem essencialmente três estágios consecutivos envolvidos: transporte do adsorbato até a superfície externa do adsorvente, difusão do adsorbato nos poros dos adsorvente e adsorção do soluto na superfície interna do adsorvente. A etapa lenta da velocidade no processo de adsorção é que governa

todo o processo. Em geral o último estágio é relativamente rápido quando comparado com os outros dois, porém a resistência externa (primeiro estágio) pode ser pequena se a agitação da solução for suficientemente alta. Portanto, a etapa determinante da velocidade de adsorção é controlada pela difusão do soluto nos poros do adsorvente. Esse mecanismo foi postulado como etapa limite de velocidade na adsorção de outros solutos (FÁVERE, 1994).

Ensaio de coluna foram realizados com a finalidade de se verificar a influência do pH, efeito da velocidade do fluxo na coluna, volume de amostra percolada na coluna, recuperação do íon e aplicação em amostras de efluentes reais.

A capacidade de adsorção (Q) dos metais (Cu (II) e Pb (II)) no sistema de coluna mostraram que a adsorção obedeceu a mesma ordem independente do adsorvente. O íon Cu (II) foi mais adsorvido que o íon Pb (II), provavelmente aqui tendo influenciado o tamanho ocupado pelo metal (FÁVERE, 1994; AMORIM, 2002).

6.5.1. Eficiência da dessorção em leito fixo

Ensaio de dessorção foram realizados com a finalidade de verificar a natureza reversível da adsorção dos íons Cu (II) e Pb (II) em esferas de QTs e QTBs. A dessorção foi estudada em pH 6,0, já que os íons OH interagem preferencialmente com os grupamentos amino protonados, deslocando os íons da superfície. Assim, ocorre a desprotonação das aminas com a formação de H₂O, tornando sua superfície ausente de sítios positivos.

Após a saturação da coluna foram realizados estudos de adsorção-dessorção com finalidade de verificar a possibilidade de reciclagem do adsorvente e recuperação do íon metálico. Os resultados de recuperação dos íons metálicos obtidos por solução de EDTA 1M mostraram que foi possível recuperar os íons metálicos com cerca de 20 mL do eluente. A técnica do uso de coluna, por permitir um procedimento de extração, separação seletiva, pré-concentração de íons metálicos de matrizes aquosas e a possibilidade da utilização de grandes volumes de amostra, foi mais vantajosa do que o de sistema em batelada.

6.6. ADSORÇÃO DE Cu (II) E Pb (II) EM BATELADA

O conhecimento do equilíbrio de adsorção é a primeira etapa na investigação do uso de um adsorvente em determinado processo de separação. As isotermas experimentais são

uma expressão da relação entre a quantidade de soluto adsorvido (q) e a concentração de soluto da fase fluida (C_e). Descrevem a capacidade de adsorção e proporcionam a avaliação do processo numa aplicação determinada, como para a seleção do adsorvente mais adequado e das quantidades requeridas. Além disso, as isotermas, juntamente com dados cinéticos, desempenham um papel importante na construção de modelos para análise e descrição dos sistemas de adsorção, permitindo uma melhor avaliação teórica e interpretações termodinâmicas.

A isoterma de adsorção dos íons metálicos nos adsorvente (QTs e QTBs) à temperatura ambiente foi obtida construindo-se uma curva de concentração do soluto na fase sólida em função de concentração do íon na fase líquida. A aplicabilidade dos dados experimentais, aos modelos de Langmuir e Freundlich, mostrados nas figuras (27 a 30) revelaram que o modelo de Freundlich pode explicar o comportamento das QTBs e que as isotermas de Langmuir se aplicam as QTs. Estes resultados indicam que o mecanismo de adsorção dos íons metálicos por esferas de QTBs ocorre em uma superfície heterogênea enquanto nas esferas de QTs a adsorção deve ocorrer em monocamada.

O mecanismo de adsorção dos íons metálicos em materiais porosos pode envolver processo de difusão do íon metálico tanto na superfície externa e interna do adsorvente como pelos seus poros (NGAH; ENDUD ; MAYANAR, 2002). No caso de equilíbrio de adsorção em sistema de batelada os três processos podem atuar simultaneamente (GUIBAL et al., 2002; SCHMUHL; KRIEG, 2001).

A equação de Langmuir (1) é válida para adsorção na superfície contendo um número limitado de sítios, sistema monocamada, mas geralmente não prediz adsorção em sistema heterogêneo, o qual é mais bem descrito pelo modelo de Freundlich. Por esse motivo, estudou-se o equilíbrio de adsorção para os íons metálicos através das equações de Langmuir e Freundlich.

Os resultados sugerem que os compostos presentes na parede celular da bactéria provavelmente interagem também com os íons metálicos através de mecanismos físico-químicos, possivelmente influenciados pela concentração bacteriana e condições ambientais. Por causa desta variabilidade, este processo não é compreendido na sua totalidade.

Em geral, paredes de células bacterianas são polieletrólitos e interagem com íons em solução para manter a eletroneutralidade. Os mecanismos pelos quais os íons metálicos se ligam à superfície de células incluem interações eletrostáticas, força de van der Waals,

ligações covalente, interação redox e precipitação extracelular, ou uma combinação desses processos. Os grupos carregados negativamente das paredes das células bacterianas (carboxil, hidroxil, e fosforil) adsorvem cátions metálico, que ficam retidos. Um estudo mostrou que algumas espécies de *Bacillus* esporulados SG-1 removem íons cobre da água de efluentes que contém metais misturados através de precipitação seguida por adsorção passiva. Além de adsorção de superfície de íons metálicos, que são normalmente reversíveis, algumas células bacterianas podem acumular metais intracelularmente. Este processo dependente do metabolismo e, portanto, dependente de energia, requer um sistema de transporte específico. A acumulação intracelular é normalmente mais lenta que a adsorção e o resultado final, em muitos casos, é mais metal ligado às células. Com algumas espécies, podem acontecer ambos os processos. Por exemplo, um estudo com *Pseudomonas aeruginosa* (QUEK et al., 2005), mostrou que o cobre acumulado era resultado de adsorção extracelular seguido por acumulação intracelular resultante da troca desse íon com cálcio e magnésio através da parede celular.

O processo de adsorção é influenciado por fatores ambientais, os quais influenciam a natureza química da superfície bacteriana e os sítios que ligam o metal. Entre esses fatores estão pH, temperatura, oxigênio e concentrações de metais inócuos como sódio, cálcio, e magnésio.

Volesky e Holan (1995) mostraram que a biosorção de metal acontece tipicamente em 5 a 15 minutos depois do contato com o sistema adsorvente-solução. Os estudos de He e Tebo (1998) mostraram que a remoção de Cu (II) de soluções aquosas é rápida e reversível na maioria dos casos. Foram ligados 60% do íon Cu (II) a bactérias dentro do primeiro minuto a pH 7,2. O equilíbrio de adsorção em uma pesquisa feita com espécies de *Bacillus* marinhas foi alcançado dentro de 10 minutos. Em outro estudo, células da bactéria *Thiobacillus ferrooxidans* em soluções aquosas adsorveram íons Cu (II) dentro de 15 minutos (BOYER; MAGNIN; OZIL, 1998). Ahn, Chung; Pak (1998), estudaram células imobilizadas de *Zoogloea ramigera*, que produzem uma camada de polissacarídeo extracelular, e mostraram um máximo de adsorção de Cu (II) em 2 horas.

Sthanley e Ogden (2003) isolaram uma espécie de *Staphylococcus* de solo contaminado e imobilizaram em esferas de Ca-alginato para estudar a remoção de cobre. Esses autores encontram excelente resultados para remoção de cobre em águas de efluentes,

mas tiveram problemas com as esferas que não foram resistentes e se desmancharam ao longo do tempo de uso.

A biosorção de níquel foi estudada usando células de algas livre de várias formas, isto é: vivas, mortas e pulverizadas, e os resultados revelaram que a forma da célula não afeta a remoção de níquel significativamente. Porém, o uso de células mortas eliminava os efeitos da toxicidade do metal, a necessidade de manutenção do crescimento, além de permitir o uso repetido das células (ABU AL-RUB et al., 2004).

6.7. FILMES E MEMBRANAS DE QUITOSANA

A produção de membranas de quitosana é um processo simples, porém, que merece alguns cuidados para obter-se um produto de qualidade. De forma qualitativa e macroscópica, as membranas e filmes de quitosana obtidos neste trabalho se mostraram bastante estáveis, com poucas falhas aparentes e ausência de macroporos. Uma das dificuldades para obtenção de materiais de boa qualidade deve-se a impurezas presentes na solução precursora. A retenção de água sobre a placa durante o processo de deposição também pode conduzir a uma secagem irregular, gerando “bolhas” e em alguns casos, destacamentos espontâneos em posições localizadas, que podem levar à ruptura do material (ASSIS ; SILVA, 2003). A imersão das membranas de quitosana em glicerol foi feita para evitar a formação de rachaduras e enrugamento, pois o glicerol tem alta propriedade plastificante. Porém esse tratamento tornou as membranas impermeáveis, configurando-se o que se chamou, neste trabalho, de filmes.

As membranas (QT) e os filmes (QTG) e membranas e filmes com bactérias imobilizadas, QTB e QTGB respectivamente, produzidos neste trabalho apresentaram superfícies irregulares, pouco homogêneas e assimétricas. Pela morfologia da superfície porosa das membranas é possível afirmar que essas podem absorver certa quantidade de umidade do ar.

QTs e QTGs apresentaram propriedades mecânicas bem parecidas ou superiores as relatadas em outros trabalhos. Britto, Campana-Filho; Assis (2005) mostraram que a resistência a tração de QTs é da ordem de 50-66 MPa e depende do grau de desacetilação e do solvente de evaporação usado.

As QTs testadas neste trabalho, com 78% de desacetilação e 117000 Da de massa, suportaram 54 MPa. QTBs foram ainda superiores, suportando até 74 MPa, ou seja, foram 27% mais resistente do que as QTs. Esses resultados não deixam dúvidas quanto ao reforço promovido nas esferas de quitosana com a imobilização da bactéria, o que garantiu produtos mais resistentes, o que é desejável para a maioria das aplicações.

O tratamento das membranas com glicerol reduziu significativamente a resistência desses materiais, como pode ser deduzido a partir das medidas de tensão de ruptura, QTG (20 MPa) e QTGB (9 MPa). QT e QTB também mostraram maiores valores de módulos de Young, 447 MPa e 493 MPa respectivamente, enquanto seus filmes, embora menos resistentes, se mostraram mais elásticos, como pode ser comprovado pelos menores valores dos módulos de Young, 146 MPa (QTG) e 223 MPa (QTGB) respectivamente. Essas diferenças físicas das QTBs e QTGBs serão úteis para justificar suas possíveis aplicações.

As propriedades físicas de filmes e membranas de quitosana com bactérias imobilizadas ainda não foram relatadas na literatura, mas os resultados deste trabalho mostram que esses materiais são mais resistentes que os preparados à base unicamente de quitosana. Quando comparado com filtros comerciais, esses produtos chegam a ser 200 vezes mais resistente.

6.8. ADSORÇÃO DE ÍONS Cu (II) E Pb (II) EM MEMBRANAS E FILMES DE QUITOSANA

Os filmes e membranas desenvolvidos neste trabalho foram submetidos a testes para verificar suas possíveis aplicações na remoção de cobre e chumbo de amostras de água doce e água do mar. Os resultados deixaram claro as diferenças entre QTs e QTBs. As QTs são muito mais permeáveis do que as QTBs, já que deixaram escoar mais rapidamente um mesmo volume das soluções de cobre e chumbo. Isso prova que a presença da bactéria provavelmente aumenta o impedimento estérico a esses íons metálicos, já que o tempo de escoamento dessas soluções aumenta com o volume adicionado.

A QTBs adsorveram mais cobre do que chumbo bem como adsorveram mais cobre e chumbo do que as QTs, demonstrando que a presença da bactéria melhorou a performance da quitosana como adsorvente de íons metálicos.

Interessantemente, os filmes de quitosana, QTGs e QTGBs, foram totalmente impermeáveis a passagem de soluções aquosas de cobre e chumbo. Além disso, QTGBs foram duas vezes mais eficientes na adsorção de cobre e chumbo do que QTGs, o que novamente demonstra a contribuição das células bacterianas imobilizadas na ligação desses íons. Isso se deve provavelmente as interações entre os grupos carregados negativamente presentes na superfície da bactéria e os íons metálicos. A impermeabilidade dos QTGBs pode ser facilmente constatada pela coloração azulada do filme após adsorção do cobre, como mostrado na figura 25.

Os MEV das membranas de QTBs revelaram a distribuição das células bacterianas por toda a superfície das membranas. Na figura 20 fica evidente o formato esférico das células, significando que o processo de imobilização não provocou alterações morfológicas detectáveis na célula. As células estão distribuídas isoladamente, mas densamente forram toda a superfície da membrana.

6.9. SIMULAÇÃO DE REMOÇÃO DE PETRÓLEO POR HDROGÉIS DE QUITOSANA COM E SEM A BACTERIA PFA001 IMOBILIZADA

A velocidade com que o petróleo se espalha após um derramamento determina seu efeito no ambiente. Em geral, os óleos derramados tendem a se espalhar sobre a superfície da água formando um filme de 0,1 mm. Os fatores que afetam a habilidade do óleo se espalhar incluem a tensão superficial, gravidade específica e viscosidade. Quando maior a tensão superficial menor a área de espalhamento. Como a temperatura reduz a tensão superficial do líquido, águas mais quentes favorecem o espalhamento do óleo. Com relação à densidade, como a maioria dos componentes do petróleo é menos densa que a água, tende a flutuar na superfície. No entanto, com a evaporação das substâncias mais leves, a densidade tende a aumentar e os óleos mais pesados podem afundar e formar *bolas de asfalto* ou interagir com rochas e sedimentos no fundo do corpo d'água (USEPA, 1999b).

O óleo derramado além de se movimentar, pode evaporar, ser degradado e emulsificar-se, reduzindo a severidade do dano e acelerando a recuperação da área afetada. Estes processos ocorrem de forma diferenciada na água doce e salgada. O impacto do derramamento na água doce pode ser mais severo devido a pouca movimentação da água neste habitat. Em águas paradas, o óleo tende a empoçar, podendo permanecer no ambiente por longo período. Nos rios e córregos, o óleo tende a ser coletado pelas plantas e gramíneas

que crescem nas margens, ou interage com os sedimentos afetando os organismos que ali vivem ou que se alimentam destes sedimentos e planta (USEPA, 1999b).

No mar aberto, peixes e baleias podem nadar para longe da mancha de óleo. Já tartarugas e golfinhos que vivem próximo às enseadas apresentam maior risco de contaminação. A contaminação de recifes por petróleo afeta diretamente os organismos aquáticos que ali vivem como camarões, ouriços e pequenos peixes.

Os peixes podem-se expor ao óleo derramado através de diferentes vias: pelo contato direto com a contaminação de suas guelras; pela absorção de compostos tóxicos presentes na coluna d'água pelos ovos e lavras; pela ingestão de alimentos contaminados. Os peixes expostos ao petróleo podem apresentar alterações cardíacas, respiratórias, hepatomegalia, redução no crescimento, diversas alterações bioquímicas, celulares, reprodutivas e comportamentais. A exposição crônica a alguns componentes do petróleo pode provocar anomalias genéticas e carcinoma em espécies sensíveis (USEPA, 1999b).

O processo preciso pelo qual a quitosana atua na absorção de óleos e gorduras não é totalmente compreendido, mas um número de observações experimentais sugere dois tipos de mecanismo: o primeiro envolve a atração eletrostática que pode ser comparada à atração de pólos magnéticos inversos; o segundo sugere um tipo de entrelaçamento que pode ser comparado ao efeito de uma rede. Nesse modelo, a quitosana se envolve ao redor das gotas de óleo ou gordura, aprisionando-as. Esse efeito, já descrito em sistemas vivos, explica, por exemplo, a grande ação do polímero sobre o emagrecimento, pois as gorduras ingeridas e entrelaçadas pela quitosana não são atraídas e digeridas pelas lipases, impossibilitando a sua assimilação pelo organismo (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999).

Os percentuais de remoção de petróleo encontrados neste trabalho confirmam a capacidade lipofílica da quitosana, bem como destaca a capacidade lipofílica e/ou hidrofóbica da parede celular do *S. saprophyticus*. Uma análise de custo/benefício dessas soluções seria de fundamental importância para a escolha da solução a ser utilizada em uma situação real de derramamento, pois tanto o hidrogel de quitosana quanto o hidrogel de quitosana contendo a bactéria *S. saprophyticus* imobilizada na proporção 1:1 (m/m) tiveram o mesmo desempenho, ou seja, removeram 90% de petróleo de amostras de água do mar, mostrando que ambos podem ser usados com essa finalidade.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho suportam as seguintes conclusões:

— A incorporação de bactérias em matriz de quitosana de camarão melhorou substancialmente as propriedades desse polímero, o que trouxe vantagens para os produtos desenvolvidos neste trabalho: esferas, membranas, filmes e hidrogéis contendo a bactéria *Staphylococcus saprophyticus* imobilizada, com potencial de aplicação em biorremediação.

— Os resultados das simulações provaram que esses produtos podem ser utilizados em atividades de biorremediação que envolvam ou necessitem de emulsificação de hidrocarbonetos (esferas), remoção de cobre e chumbo (esferas, membranas e filmes). Os hidrogéis de quitosana sem e com bactérias imobilizadas podem ser usados como coadjuvantes na limpeza de petróleo em água do mar e água doce.

— Os produtos desenvolvidos neste trabalho são biodegradáveis, resistentes e não causam danos ao homem e ao ambiente.

— São produtos ainda não confeccionados no Brasil, com alto grau de inovação, além de ecologicamente corretos, por serem produzidos a partir de subprodutos da carcinicultura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU AL-RUB, F. A.; EL-NAAS, M. H.; BENYAHIA, F.; ASHOUR, I. Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. **Process Biochemistry**, v. 39 p. 1767–1773, 2004.

AHN, D.; CHUNG, Y; PAK, D. Biosorption of heavy metal ions by immobilized *zoogloea* and zooglan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 73, p. 43-50, 1998.

ALEXANDER, M. Effect of Chemical Structures on Biodegradation. In: _____ **Biodegradation and Bioremediation**. 2 ed, Ed. New York: Academic Press, Cap 11, p. 177-194, 1999a.

ALEXANDER, M. Environmental Effect. In: _____ **Biodegradation and Bioremediation**. 2 ed, Ed. New York: Academic Press, Cap 14, p. 269-298, 1999b.

AMORIM, A. G. N. Estudos da capacidade de adsorção de íons de **Cu (II)**, **Pb(II)**, **Ni (II)** e **Cd(II)** pelas microesferas de quitosana e quitosana reticulada em sistema de coluna e batelada. Monografia (Curso de Química Industrial) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 36p, 2002.

ASSENHAIMER, C.; RUBIO. J. **Purificação de águas contendo íons sulfato usando resíduos do processamento do camarão**. XIX Prêmio Jovem Cientista – 2003 – Água - Fonte da Vida. p. 42, 2003.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v.13, n. 4, 2003.

ASTM, Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. In: _____ **Annual Book of ASTM Standards**, v. 8. 01. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, p. 182–190, 1995.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Fundamentals and Applications, 3 ed., The Benjamin/Cummings Publ. Co., Inc., CA, USA. 563p, 1972.

ATLAS, R.M. Bioremediation of Petroleum Polluants. **International Biodeterioration ; Biodegradation**, p. 317-327, 1995.

BASSI, R; PARSHER, S. O. Removal of selective metal ions from aqueous solutions using chitosan flakes. **Separation Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 547-560, 2000.

BATLEY S. E.; OLIN T. J.; BRICKAR R. M. E. ; ADRIAN. D. E. A Review of Potentially Low-Cost Sorbents For Heavy Metals. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2469, 1999.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells, In _____ **Methods in Biotechnology**. SHUMAUSER, H. P. Totowa: Humana press, v. 1 p. 1-11, 1997.

BOYER, A.; MAGNIN, J; OZIL, P. Copper ions removal by *Tiobacillus ferrooxidans* biomass. **Biotechnology Letters**, v. 2, n. 2, p. 187-190, 1998.

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

CANELLA, K. M. N. C; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – Influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.13-17, 2001.

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

CHAGAS, W. F. **Estudo de patógenos e metais em lodo digerido bruto e higienizado para fins agrícolas, das estações de tratamento de esgotos da Ilha do Governador e da Penha no estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, ENSP, Rio de Janeiro. 89 p, 1999.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, p. 261-268, 2001.

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

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

CHEVALIER, P.; NOUE, J. L. Wastewater nutrient removal with microalgas immobilized in carrageenan. **Enzymes Microbiology Technology**, v. 7, p. 621-624, 1985.

CHUI, V. W. D.; MOK, K. W.; LUONG, B. P. ; MA, K. K. Removal and recovery of copper(II), Chromium(III), and Nickel(II) from solutions using crude shrimp chitin packed in small columns. **Environment International**, v. 22, p. 463-468, 1996.

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

COONEY, D. O. **Adsorption Design for Wastewater Treatment**. Lewis Publishers, Londres. 190p, 1999.

COSTA, S. P. **Biodegradabilidade de n-hexadecano por bactérias livres e imobilizada em quitosana**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100p, 2006.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana: a fibra do futuro**. PADETEC, Fortaleza, 124p, 1999.

CUNNINGHAM, C. J.; IVSHINA, I. B.; LOZINSKY, V. I.; KUYUKINA, M. S. ; PHILP, J. C. Biorremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol. **International Biodeterioration ; Biodegradation**, v. 54, p. 167-174, 2004.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, G.M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.

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

DUTTA, K. P.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DUTTA, J. Chitin and chitosan for versatile applications. **Journal Macromolecular Science**, v. 42 (3), p.307-354, 2003.

FÁVERE, V. T. **Adsorção de íons Cu(II), Cd (II), Ni(II), Pb(II) e Zn(II) pelo biopolímero quitina, quitosana e pelas quitosanas modificadas**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Rio Grande do Sul. 152p, 1994.

FOCHER, B.; NAGGI, A.; TORRI, G.; COSANI, A.; TERBOJEVICH, M. **Carbohydrate Polymer**, v.18, p. 43, 1992.

GAMZAZADE, A. I.; NASIBOV, S. M.; ROGOZHIN, S. V. Study of lipoprotein sorption by some sulfoderivatives of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.34, p. 381-384, 1997.

GANDHIRAJAN, M.; SWAMINATHAN, C.S. Coagulation of Oil Field Wastewater with Chitosan. **Journal Indian Chemical Society**, v.74, p. 257, 1997.

GARCÍA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Characterization of composite hydrocolloid films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 339–34, 2004.

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

GOMES, R. V. **Isolamento e Caracterização da Microbiota Presente em Amostras de Petróleo Pesado e Estudo da Produção de Biossurfactantes por uma Cepa de Staphylococcus aureus Seleccionada**. Monografia (Curso de Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 83p, 2004.

GOOSEN, M. F. A. **Applications of Chitin and Chitosan**, Technomic Publishing Company, Pennsylvania, U.S.A., 336p, 1997.

GUIBAL, E.; SATRE, A.; RUIZ, M. Pd and Pt recovery using chitosan gel beads. I. Influence of the drying process on diffusion properties. **Separation Science and Technology**, v. 37, no. 9, p. 2143-216, 2002.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a Review. **Separation and Purification**, v. 38, p. 43-74, 2004.

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

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

GUPTA, V. K. Equilibrium uptake, sorption dynamics, process development, and column operations for the removal of copper and nickel from aqueous solution and wastewater using activated slag, a low-cost adsorbent. **Industrial ; Engineering Chemistry Research**, v.37, p. 192-202, 1998.

HE, L. M.; TEBO, B. M. Surface charge properties of and Cu(II) adsorption by spores of the marine *Bacillus* sp. Strain SG1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 1123-1129, 1998.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM; L. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. **Journal of Microencapsulation**, v. 16, p. 343-355, 1999.

IONATA, E.; BLASIO, P.; CARA, F. Microbiological degradation of pethane by immobilized cells of *Achromobacter* sp. **Biodegradation**, v. 16, p. 1-9, 2005.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude-oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma-ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, no.3, p. 176-179, 1995.

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

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

KAMOGAWA, M. Y.; MIYAZAWA, M.; GIMENEZ, S. M. N.; OLIVEIRA, E. L. Avaliação da absorção do zinco por feijoeiro e sua toxidez em latossolo roxo distrófico. SANARE: **Revista Técnica da SANEPAR**, v. 8, n. 8., 1997.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme Immobilization. In _____ **Biotechnology**. KENNEDY, J. F. (Ed.). New York: Cambrige: Basel:VCH, 1987, v. 7 Enzyme Technology, p. 348-404, 1987.

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

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

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid ; Interface Science**, v.7, p.12-20, 2002.

LARISON. J. R.; LIKENS. E.; FITZPATRICK. J. W.; CROCK J. G. Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado rocky mountains. **Nature**, v. 406 p. 181–183, 2000.

LEE, M. Y.; HONG, K. J.; KAJICHI, T.; YANG, J. I. W. Synthesis of chitosan based polymeric surfactants and their adsorption properties for heavy metals and fatty acids. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 152-158, 2005.

LEE, S. T.; MI, F. L.; SHEN, Y.J.; SHYU, S. S. Equilibrium and kinetic studies of copper (II) ion uptake by chitosan tripolyphosphate chelating resin. **Polymer**, v. 42, p.1879-1892, 2001.

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

LYNCH, J. M.; HOBBIE, J. E. **Micro-organisms in Action: Concepts and Applications in Microbial Ecology**. Blackwell Scientific Publ., UK. p.332- 347, 1988.

MAACHI, R.; ABOUSSEOD, M.; CHAABANE, T. Kinetics of biodegradation of petroleum by *Pseudomonas* sp. **Desalination**, v.139, p.367, 2001.

MADHALLY, S. V. ; MATHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, p. 1133-1142, 1999.

MARTON, J. M. **Avaliação de um sistema contínuo composto por colunas de carvão ativo e resinas de troca iônica para o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, São Paulo, 218p, 2005.

MCKAY, G. **Use of adsorbents for the removal of pollutants from wastewaters**. CRC Press, Londres. 186p, 1996.

MODESTO, C. M. D. **Adsorção de Íons Cd (II) em quitosana e N-carboximetilquitosana em sistema de coluna e batelada**. Monografia (Curso de Química Industrial) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 33p, 2003.

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

MOUNTOURIS, E.; VOUTSAS, A; TASSIOS, D. Bioconcentration of heavy metals in aquatic environments: the importance of bioavailability. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 1136–1141, 2002.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NGAH, W. S. W.; ENDUD, C. S. ; MAYANAR, R. Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **Reactive ; Funcional Polymers**, v. 50, p.181-190, 2002.

NITSCHKE, M; PASTORE, M. G. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NO, H. K.; MEYERS, S. P. Preparation of Chitin and Chitosan. In:_____ **Chitin Handbook**, R. A. A. MUZZARELLI ; M. G. PETERS (eds.), European Chitin Society, p.475.1997.

NUNES, A. J. P.; PARSONS, G. J. Feeding Levels of the Southern Brown Shrimp *Penaeus subtilis* in Response to Food Dispersal. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30 (3) p. 331-348,1999.

OH, Y. S.; MAENG, J.; KIM, S. J. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 418-423, 2000.

PADILHA, P. M.; ROCHA, J. C.; MOREIRA, J. C.; CAMPOS, J. T. S. ; FEDERICI, C. C. Preconcentration of heavy ions from aqueous solutions by means of cellulose phosphate: and application in water analysis. **Talanta**, v. 45, p. 317-323, 1997.

PAJE, M. L.; MARKS, P.; COUPERWHITE, I. Degradation of benzene by a *Rhodococcus sp.* using immobilized cells systems. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 14, p. 675-680, 1998.

PAQUOTTE, P.; CHIM, L.; MARTIN, J. L. M.; LEMOS, E.; STERN, M.; TOSTA, D. Intensive culture of shrimp *Penaeus vannamei*. In _____ **floating cages: zootechnical, economic and environmental aspects**. Ed. Elsevier Science, p. 1-16, 1998.

PEREIRA, L. A. **Cultivo do camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) em tanques-rede no litoral paranaense: Estudo de caso**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 101p, 2004.

PINZON BELLO, J. A. Superfície específica de uma bentonita mediante la adsorción de azul de metileno. **Revista Colombiana de Química**, v. 26(1), 1997.

PIRES, J DE A.; MACHADO, E. P.; BITTAR, N. **Riscos à saúde e ao ambiente por mercúrio**. Caderno Técnico de Engenharia Sanitária. Rio de Janeiro, v. 27 n. 4. 1988.

QUAN, X.; SHI, H.; ZHANG, Y.; WANG, J. ; QIAN, Y. Biodegradation of 2,4- diclorofenol and phenol in airlift inner-loop bioreactor immobilized with *Achromobacter* sp. **Separation and Purification Technology**, v. 34, p. 97-103, 2004.

QUEK, E.; TING, Y. P. ; TAN, H. M. *Rhodococcus* sp F92 Immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. **Bioresource Technology**, p. 1-7, 2005.

REID, B. J.; JONES, K. C.; SEMPLE, K. T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments: a perspective on mechanisms, consequences and assessment. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 103-112, 2000.

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

ROCHA, I. P.; MAIA, E. P. Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira. In: _____ Valenti, W.C., Zimmermann, S., Poli, C.R., Poli, A. T.B., Moraes, F.R., Volpato, G., Câmara, M.R. (Eds.), **Anais do Aqüicultura Brasil 98**, 2-6 novembro 1998, Recife, Brasil. Capítulo Latino-Americano da World Aquaculture Society, . João Pessoa, Brasil, p. 213-235, 1998.

RODRIGUES, C. A. **Aproveitamento da casca do camarão: Quitina e polímeros derivados**. I Workshop Brasileiro em Aproveitamento de Sub-Produtos do Pescado. Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, 2003.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Minireview: Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

ROQUE, O.C.C. **Sistemas Alternativas de Tratamento de Esgotos Aplicáveis as Condições Brasileiras**. Tese (Doutorado em Saúde Pública), Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 153 p, 1997.

RORRER, G. L.; HSIEN, T-Y.; WAY, J. D. Synthesis of Porous-Magnetic Chitosan Beads for Removal of Cadmium Ions from Waste Water. **Industrial ; Engineering Chemistry Research**, v. 32, p. 2170-2178, 1993.

ROSATO, Y. B. Biodegradação de petróleo. In: _____ **Microbiologia Ambiental**. MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Jaguariúna; EMBRAPA/CNPMA. p. 308-334, 1997.

SANEPAR. Companhia de Saneamento do Paraná: **Manual Técnico para Utilização Agrícola do lodo de esgoto no Paraná**. 96 p, 1997.

SIGNINI, R; CAMPANA-FILHO, S. P. Características e propriedades de quitosana purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001.

SCHMUHL, R.; KRIEG, H. M. Adsorption of Cu (II) and Cr (II) by Chitosan: Kinetics and equilibrium studies. **Water Research Commission**, v. 27, p. 1-7, 2001.

SHIRAKAWA, M. A.; JONH, V. N.; CINCOTTO, M. A.; GAMBALE, V. Contaminação da água Subterrânea por Hidrocarbonetos de Petróleo e Conseqüentemente Biodeterioração de Concerto Projetado em Túnel. In: _____ **Biodegradação: Contribuição do II Workshop sobre Biodegradação**. Campinas, SP, Brasil 13-20 de junho, Empraba Meio Ambiente, 2001.

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

STHALEY, L. C.; OGDEN, K. L. Biosorption of cobre(II) from chemical mechanical planrization wastewaters. **Journal of Environmental Management**, v. 69, p. 289-297, 2003.

SURYANARAYANA S. V.; YASHODHA, K. P.; MATTENDRAKAR, N.; PUTTARAJAPPA, P. Deacetylation of chitin at low temperature by a novel álcali impregnation technique. **Indian Journal of Technology**, v. 25. p. 194-196, 1987.

TEIXEIRA, F.H. **Estudo Comparativo para Metais em Ambiente Aquático (Bacia Hidrográfica do Rio Guandu – RJ)**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 120 p, 1998.

TENG W.L.; KHOR E.; TAN T. K.; LIM L. Y.; TAN, S. C. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. **Carbohydrate Polymers**, v. 332(3), p. 305-316, 2001.

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

TIANWEI, T.; XIAOJING, H.; WEIXIA, D. Adsorption behaviour of metal ions on imprinted chitosan resin. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.76, p.191-195, 2001.

TOMAS, J. E. **Fundamentos da Engenharia do Petróleo**, Editora: Interciência 2ª Edição p.272, 2001.

United States Pharmacopeia USP 23, p. 1746, 1995.

United States Pharmacopeia USP 23, p. 1801, 1995.

United States Pharmacopeia USP 23, p. 1819, 1995.

United States Pharmacopeia USP 23, p. 1840, 1995.

United States Pharmacopeia USP 23, p.1731, 1995.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Office of Compliance. Office of Enforcement and Compliance Assurance. **Profile of the petroleum refining industry**, Washington, 1995b

VAN DE VELDE, F.; LOURENÇO, N.D.; PINHEIRO, H.M.; BAKKER, M. Carrageenan: a food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. **Advanced Synthesis ; Catalysis**, v. 344, p. 815–835, 2002.

VAN HAMME, D. J.; SINGH, A; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, No. 4, 503-549, 2003.

VOLESKY, B ; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 2, p. 235-247, 1995.

WAINBERG, A. A.; CAMARA, M. R.; MILLAMENA, O. M.; TRIO, A. T. ; MADENJIAN, C. P. Brazilian shrimp farming ... it's growing, but is it sustainable?. **Aquaculture**, v. 29, n. 1, p. 26-30, 1998.

WANG J.; QIAN Y. Microbial degradation of 4-chlorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan-chitosan gels. **Chemosphere**, v. 38, n. 13, p. 3109 -3117, 1997.

WARILA, J.; S. BATTERMAN, D. R.; PASSMO-READER. A Probabilistic Model for Silver Bioaccumulation in Aquatic Systems and Assessment of Human Health Risks, **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 20(2), p. 432-441, 2001.

WASE, D. J.; FORSTER, C. F. **Biosorbents for Metal Ions**, Taylor and Francis, London,. 238p, 1997.

WESKA, R. F.; MOURA, J. M.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. **Obtenção de quitosana a partir de resíduos da indústria pesqueira**, VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Campinas, 24 a 27 de julho de 2005.

WOODWARD, J. Methods of immobilization of microbial-cells. **Journal Microbiology Methods**, v. 8, p.91-102, 1988.

ZAKARIA, Z.; HALL, G.M.; SHAMA, G. Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. **Process Biochemistry**, v.33, p. 1-6, 1998.