



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL  
CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

**BARBARA CHAVES AGUIAR BARBOSA**

**MICODEGRADAÇÃO DE METIL PARATION E ATRAZINA EM MATRIZ  
AQUOSA SINTÉTICA UTILIZANDO *ASPERGILLUS NIGER* AN 400**

**FORTALEZA**

**2016**

**BARBARA CHAVES AGUIAR BARBOSA**

**MICODEGRADAÇÃO DE METIL PARATION E ATRAZINA EM MATRIZ  
AQUOSA SINTÉTICA UTILIZANDO *ASPERGILLUS NIGER* AN 400**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: Doutor em Engenharia Civil – Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Marisete Dantas de Aquino.

Coorientadora: Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva.

**FORTALEZA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B195m Barbosa, Bárbara Chaves Aguiar.  
Micodegradação de metil paration e atrazina em matriz aquosa sintética utilizando *Aspergillus niger* AN 400 / Bárbara Chaves Aguiar Barbosa. – 2016.  
125 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Marisete Dantas de Aquino.  
Coorientação: Prof. Dr. Glória Maria Marinho Silva.

1. *Aspergillus niger* AN 400. 2. atrazina. 3. biorreatores. 4. metil paration. 5. micodegradação. I. Título.  
CDD 628

---

**BARBARA CHAVES AGUIAR BARBOSA**

**MICODEGRADAÇÃO DE METIL PARATION E ATRAZINA EM MATRIZ  
AQUOSA SINTÉTICA UTILIZANDO *ASPERGILLUS NIGER* AN 400**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: Doutor em Engenharia Civil – Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 27/09/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marisete Dantas de Aquino (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Glória Maria Marinho Silva (Co-Orientadora)  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

---

Prof. Dr. George Satander Sá Freire  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Técia Vieira Carvalho  
Parque de Desenvolvimento Tecnológico – PADETEC

---

Prof. Dr. Maurício Alves da Motta Sobrinho  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

*Ao LATAM, minha segunda casa durante nove anos, e às professoras Kelly e Glória por todo acolhimento, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A jornada de um doutorado é impossível sem ajuda e apoio de muitas pessoas queridas.

Começo meus agradecimentos rogando a Deus tão misericordioso! Apenas Ele sabe de tudo que foi necessário para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha amada família, que de certa forma nunca entendeu muito bem meu trabalho, mas sempre apoiou e me fortaleceu diante de inúmeras dificuldades. Obrigada pai (meu gordinho), mãe, Itinho, irmã! Obrigada por me presentear com a melhor família que Deus poderia ter me dado! Aos meus pequenos Ana, Matheus, Francisco e Isaac, obrigada por me fazerem uma pessoa melhor.

Ao meu amado Danilo! Meu gigante, que sempre esteve comigo, nos bons e maus momentos, és minha FORTALEZA. Obrigada por me ajudar a construir a *nossa Jerusalém*.

Aos meus sogros, Socorro e Paulo, que desde 2012 se tornaram meus segundos pais. Obrigada por tudo!

À família Barroso Celedônio, que me acolheu como filha, irmã e cunhada, que mesmo sem saber ao certo, sempre me apoiou.

À minha amada amiga, Cristina Juliane, por todo carinho e preocupação comigo. Ju, você tem um espaço imenso em meu coração!

À professora Marisete, por aceitar ser minha orientadora e por toda paciência e acompanhamento no decorrer dessa caminhada.

À professora Kelly Rodrigues, minha primeira orientadora, que sempre me apoiou e se fez presente quando era preciso, obrigada por todo conhecimento repassado e por toda força que me deste!

À professora Glória, que me acolheu no mestrado e aceitou trilhar como co-orientadora os árduos caminhos do doutorado. Agradeço também pela oportunidade ímpar que me concedeu, pois estudar fora sempre foi um sonho guardado no fundo de um velho baú! Obrigada pelo companheirismo, pelo apoio, pela paciência e pela dedicação à pesquisa.

Ao Evandro Martins, por toda acolhida, juntamente com a professora Glória, em Portugal! Com certeza minha estadia foi melhor com a presença de vocês!

Aos meus queridos amigos do LATAM! Como a boa convivência com vocês me engrandeceu e enriqueceu. Aqui não coloco por ordem de importância, a presença de vocês em minha vida foi algo muito além de uma mera lista de “quereres”! Não me esqueçam:

Andreza, Alana, Yasmin (filhinha), Priscila (filhinha), Luana (a adotada), Siebra, Amorin, Cavalcante, Nivia (como vou sentir falta dos nossos almoços), Ígor (lindo!), Nathália (implicante), Amanda, Cléber, Modiane, Gustavo, vocês são muito especiais.

Ao Marcus, pela grande ajuda com o tratamento estatístico dos dados.

À querida Luciane, por me ajudar incessantemente no início da pesquisa e por ser uma amiga querida, além de uma ótima parceira de trabalhos.

À minha caçulinha Rejane! Amiga muito querida que a vida me deu! Como sempre digo, você foi um presente que Deus me enviou. Obrigada por ser tão presente e por compartilhar tantas coisas boas!

À Carla Bastos, pelos ensinamentos com o cromatógrafo e pela imensa ajuda com o planejamento experimental.

Ao André Gadelha, que muitas vezes me mostrou onde estava o erro, literalmente! Obrigada pela ajuda com os cromatógrafos.

Ao professor Ronaldo, pela disponibilização do LAT para as análises de cromatografia.

À professora Técia, por me ajudar com os solventes e pela participação na banca de defesa deste trabalho.

Ao professor Rinaldo pela ajuda laboratorial no início da pesquisa e pelo suporte concedido com o empréstimo dos *vials*.

Ao professor Suetônio Mota, por todas as contribuições na banca de qualificação.

Ao professor Raimundo, pelas contribuições fornecidas na banca de qualificação deste estudo.

Ao professor Maurício pela participação na banca de defesa.

Ao professor George Satander pela participação na banca de defesa.

Não poderia deixar de agradecer aos que fizeram parte do doutorado sanduíche em Braga - PT!

Obrigada professora Madalena Alves! Sem seu aval e sua postura extremamente profissional, meu estágio não teria sido o mesmo.

À Luciana Pereira, por toda ajuda com o estágio em Braga! Obrigada por todo conhecimento repassado e pela acolhida! Obrigada também por toda ajuda com o *abstract* da tese.

Ao professor Nelson Lima, por aceitar me receber em parceria com a professora Madalena e por disponibilizar a Micoteca da Universidade do Minho para realização dos

estudos do doutorado sanduíche. Obrigada pela paciência e por todo conhecimento transmitido!

À Célia Soares, obrigada pela paciência e pela ajuda com a identificação morfológica e molecular do meu fungo querido! Obrigada pelo valioso conhecimento que você, diariamente, me repassou.

À Juliana, por tornar meus dias em Braga ainda melhores! Obrigada pelo apoio!

À querida Patrícia Dias, pela companhia sempre agradável e por me ajudar a entender o *Graphpad*.

Aos professores do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, pelo conhecimento repassado ao longo das disciplinas do doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, pelo auxílio.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Que bom que tenho a agradecer ajuda de tantas pessoas! Meus sinceros agradecimentos a todos que me encaminharam até aqui.

*“De pouco em pouco a gente foi erguendo o nosso próprio trem  
Nossa Jerusalém  
Nosso mundo, nosso carrossel.  
Vai e vem vai  
E não para nunca mais...  
De tanto não parar a gente chegou lá  
Do outro lado da montanha onde tudo começou”*

*Pra sonhar – Marcelo Jeneci*

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 em degradar os pesticidas atrazina (herbicida) e metil paration (inseticida) de matriz aquosa sintética. A pesquisa teve como focus a recalcitrância dos pesticidas e a possibilidade de micorremediação desses compostos. O trabalho foi dividido em 10 etapas: produção dos esporos pela espécie fúngica; teste de tolerância do *Aspergillus niger* AN 400 aos compostos, em placas de petri, testando-se as concentrações de 5 a 50 mg L<sup>-1</sup>; reatores em batelada com biomassa dispersa em mesa agitadora com diferentes rotações, 150 e 80 rpm, com tempo de reação de 9 dias; batelada aerada por minicompressores, com biomassa dispersa com tempo de reação de 9 dias; reator em bateladas sequenciais, com biomassa imobilizada e com tempo de reação de 7 dias; planejamento experimental da etapa com biomassa imobilizada; teste biológico; teste de toxicidade dos pesticidas e produtos de biodegradação, em cebolas; ensaio de saturação dos pesticidas na biomassa e no meio suporte e identificação molecular do *Aspergillus niger* presente nos reatores com biomassa imobilizada. Nas etapas de III a VI foram analisados os seguintes parâmetros: demanda bioquímica de oxigênio (DQO) e pH. A degradação dos pesticidas foi monitorizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Na etapa II, referente ao teste de tolerância aos pesticidas, observou-se crescimento radial do *Aspergillus niger* em todas as placas de petri, tanto na presença de atrazina como de metil paration. Com base nesses resultados, foi escolhida a concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> de pesticida para as etapas seguintes. Na etapa III, a rotação de 150 rpm foi a que proporcionou maiores percentuais de remoção tanto de atrazina quanto de metil paration, com remoções de 20% para atrazina e 45% para metil paration nos reatores em que não houve presença de metanol. Para esta fase, a DQO, nos reatores com atrazina, alcançou remoção de 99% com 150 rpm e de 85% com 80 rpm. Nos reatores com metil paration, a DQO removida foi de 95%, após 4 dias de operação a 150 rpm, e de 53% após 9 dias a 80 rpm. O pH, para os dois tipos de reatores, permaneceu na faixa ácida. Na etapa IV, a melhor condição de degradação dos pesticidas foi na ausência de metanol, obtendo-se remoções de atrazina de 71, 79, 64, 52, 43, 77 e 64%, respectivamente para reatores sem glicose e com 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 g L<sup>-1</sup> de glicose no meio. A DQO nos reatores sem metanol ficou abaixo do limite permitido pela SEMACE, na portaria 154/2002, referente ao lançamento de efluentes tratados. O pH dos reatores com glicose tendeu a acidez, enquanto naqueles em que havia apenas a presença dos pesticidas aumentou ligeiramente. Na etapa V, a remoção de atrazina foi menor do que na etapa com biomassa dispersa, ao contrário do obtido no reator com metil paration, para o qual as remoções médias foram superiores às encontradas na etapa com biomassa dispersa, sendo a melhor condição àquela em que houve adição de 1 g L<sup>-1</sup> de glicose (95 ± 2) %. No planejamento experimental verificou-se que a concentração dos pesticidas e da glicose têm um efeito significativo sobre o tratamento. No teste biológico observou-se predomínio dos fungos em detrimento das bactérias. Com relação ao teste de toxicidade com cebolas, a toxicidade das soluções contendo os pesticidas diminuiu após o tratamento com *Aspergillus niger*. A partir da biologia molecular, confirmou-se a espécie *Aspergillus niger* AN 400 presente nos reatores. Em suma, este estudo indica a possibilidade de utilização do *Aspergillus niger* AN 400 na remediação de pesticidas.

**Palavras-Chave:** *Aspergillus niger* AN 400; atrazina; biorreatores; metil paration; micodegradação.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the ability of the fungal species *Aspergillus niger* AN 400 to degrade atrazine (herbicide) and methyl parathion (insecticide) from a synthetic aqueous matrix. The research has focused on the recalcitrance of both pesticides and on the possibility of mycoremediation of these compounds. The work was divided into 10 stages: production of spores by fungal species; tolerance test of *Aspergillus niger* AN 400 to the compounds, by testing concentrations from 5 to 50 mg L<sup>-1</sup> in petri dishes; batch reactors with biomass dispersed in shaker at different speeds, 150 and 80 rpm, with a reaction time of 9 days; batch reactors aerated by minicompressores with biomass disperses, with a reaction time 9 days; sequencing batch reactor with immobilized biomass and reaction time of 7 days; experimental design; biological test; toxicity test of pesticide and biodegradation products, towards onions; tests of pesticides saturation in biomass and on support medium and molecular identification of *Aspergillus niger* present in the reactors with immobilized biomass. In steps III to VI the following parameters were analyzed: biochemical oxygen demand (COD) and pH. The degradation of pesticides was monitored by high performance liquid chromatography (HPLC). In the stage II, referent to the tolerance test to pesticides, radial growth of *Aspergillus niger* was noted in all Petri dishes, both in the presence of atrazine and methyl parathion. Based on these results, the concentration of 30 mg L<sup>-1</sup> of pesticide was chosen for the following stages. In the stage III, the rotation which gave the highest removal percentage of both atrazine as methyl parathion was 150 rpm, leading to 20% of atrazine removal and 45% of methyl parathion, in reactors in the absence of methanol. The COD in the reactors with atrazine reached 99% of removal at 150 rpm and 85% at 80 rpm. In reactors with methyl parathion, COD removal was 95%, after 4 days of operation at 150 rpm, and 53% after 9 days at 80 rpm. The pH for both types of reactors remained in the acidic range. In stage IV, the best condition for pesticide degradation was the absence of methanol, yielding atrazine removals of 71, 79, 64, 52, 43, 77 and 64%, respectively for reactors without glucose and 0.5, 1, 2, 3, 4 and 5 g L<sup>-1</sup> of glucose in the medium. COD in reactors with methanol was below the limit allowed by SEMACE, regulation 154/2002, regarding the release of treated effluent. The pH of the reactors with glucose tended to the acidity, while those in which there was only the presence of pesticides has slightly increased. In the stage V, the removal of atrazine was lower than in the stage with dispersed biomass, unlike obtained in the reactor with methyl parathion, for which the average removals were higher than those found in the stage with dispersed biomass, with the best results obtained in reactors with 1 g L<sup>-1</sup> of glucose (95 ± 2)%. By the experimental design it was found that the concentration of pesticides and glucose have a significant effect on the treatment. In the biological tests, fungi predominate instead of bacteria. With respect to the toxicity test with onions, the toxicity of the solutions containing pesticides is reduced after the treatment with *Aspergillus niger*. From the molecular biology studies, the specie present in reactors was confirmed as *Aspergillus niger* AN 400. In summary, this study indicates the possibility of using *Aspergillus niger* AN 400 in the remediation os pesticides.

**Keywords:** *Aspergillus niger* AN 400; atrazine; bioreactores; methil paration; micodegradation.

## LISTA DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Figura 1  | – Processos que afetam o destino ambiental dos agrotóxicos.....   | 26 |
| Figura 2  | – Movimento dos agrotóxicos no ambiente por caminhos abióticos e bióticos.....  | 27 |
| Figura 3  | – Fórmula estrutural do metil paration.....   | 26 |
| Figura 4  | – Metabolismo do metil paration em humanos.....   | 30 |
| Figura 5  | – Fórmula estrutural da Atrazina.....   | 31 |
| Figura 6  | – Fluxograma de desenvolvimento da pesquisa.....  | 43 |
| Figura 7  | – Câmara de Neubauer.....   | 44 |
| Figura 8  | – Esquema da mesa agitadora utilizada na Etapa III.....   | 45 |
| Figura 9  | – Modelo do reator utilizado na batelada aerada com biomassa dispersa.....  | 46 |
| Figura 10 | – Modelo do reator utilizado na batelada aerada com biomassa imobilizada.....   | 49 |
| Figura 11 | – Teste de torelância com o pesticida atrazina com a espécie <i>A.niger</i> com 7 dias.....   | 58 |
| Figura 12 | – Teste de torelância com o pesticida metil paration com a espécie <i>A.niger</i> com 7 dias.....   | 60 |
| Figura 13 | – Influencia da rotação na concentração de ATZ e sua remoção ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm com adição de metanol..... | 61 |
| Figura 14 | – Variação do pH nos reatores contendo ATZ ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm com adição de metanol.....                   | 63 |
| Figura 15 | – Influencia da rotação na concentração de MP e sua remoção ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm com adição de metanol.....  | 64 |
| Figura 16 | – Variação do pH nos reatores contendo MP ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm com adição de metanol.....                    | 64 |
| Figura 17 | – Influencia da rotação na concentração de ATZ e sua remoção ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm, sem metanol.....          | 66 |

|           |   |  |    |
|-----------|---|--|----|
| Figura 18 | – | Variação do pH nos reatores contendo ATZ ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm sem metanol.....                            | 67 |
| Figura 19 | – | Concentração de MP e sua remoção ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm, sem metanol.....                                   | 68 |
| Figura 20 | – | Variação do pH nos reatores contendo MP ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm sem metanol.....                             | 69 |
| Figura 21 | – | Concentração da ATZ ao longo da batelada com biomassa dispersa, com adição de metanol.....   | 72 |
| Figura 22 | – | Decaimento da concentração da ATZ ao longo da batelada com biomassa dispersa, com adição de metanol seguindo cinética de primeira ordem..... | 73 |
| Figura 23 | – | Remoção de ATZ com TR de 9 dias nas bateladas com biomassa dispersa, com adição de metanol e variação de glicose.....                        | 74 |
| Figura 24 | – | Variação de pH ao longo da batelada com biomassa dispersa de ATZ, com adição de metanol e variação de glicose.....                           | 75 |
| Figura 25 | – | Concentração de DQO ao longo da batelada com biomassa dispersa de ATZ, com adição de metanol e variação de glicose.....                      | 77 |
| Figura 26 | – | Remoção de MP com TR de 9 dias nas bateladas com biomassa dispersa, com adição de metanol e variação de glicose.....                         | 79 |
| Figura 27 | – | Concentração da MP ao longo da batelada com biomassa dispersa, com adição de metanol e variação de glicose.....                              | 80 |
| Figura 28 | – | Variação de pH ao longo da batelada com biomassa dispersa de MP, com adição de metanol e variadas concentrações de glicose.....              | 81 |
| Figura 29 | – | Remoção de DQO com TR de 9 dias nas bateladas com biomassa dispersa, com adição de metanol e variação de glicose.....                        | 82 |
| Figura 30 | – | Concentração de ATZ ao longo da batelada com biomassa dispersa, sem adição de metanol e variação de glicose.....                             | 84 |
| Figura 31 | – | Remoção de ATZ com TR de 9 dias nas bateladas com biomassa dispersa, sem adição de metanol e variadas concentrações de glicose.....          | 85 |
| Figura 32 | – | Variação de pH ao longo da batelada com biomassa dispersa de ATZ, sem adição de metanol.....   | 86 |

|           |   |  |     |
|-----------|---|--|-----|
| Figura 33 | – | Concentração de MP ao longo da batelada com biomassa dispersa, sem adição de metanol e concentrações variadas de glicose.....  | 88  |
| Figura 34 | – | Remoção de MP ao longo da batelada com biomassa dispersa, sem adição de metanol e variadas concentrações de glicose.....   | 90  |
| Figura 35 | – | Variação de pH ao longo da batelada com biomassa dispersa de MP, sem adição de metanol e variadas concentrações de glicose.....  | 91  |
| Figura 36 | – | Percentual de remoção de ATZ nos ciclos de I a V, com as concentrações de glicose 0,5 g L <sup>-1</sup> , 1 g L <sup>-1</sup> e 2 g L <sup>-1</sup> no reator com ATZ, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.....                                  | 93  |
| Figura 37 | – | Variação de pH nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose 0,5 g L <sup>-1</sup> , 1 g L <sup>-1</sup> e 2 g L <sup>-1</sup> no reator com ATZ, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.....  | 94  |
| Figura 38 | – | Variação da remoção de DQO em termos de percentual nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose 0,5 g L <sup>-1</sup> , 1 g L <sup>-1</sup> e 2 g L <sup>-1</sup> no reator com ATZ, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.....            | 95  |
| Figura 39 | – | Variação da concentração de DQO nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose 0,5 g L <sup>-1</sup> , 1 g L <sup>-1</sup> e 2 g L <sup>-1</sup> no reator com ATZ, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.....                               | 96  |
| Figura 40 | – | Percentual de remoção de MP nos ciclos de I a V, com as concentrações de glicose 0,5 g L <sup>-1</sup> , 1 g L <sup>-1</sup> e 2 g L <sup>-1</sup> no reator com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.....  | 97  |
| Figura 41 | – | Variação da remoção de DQO em termos de percentual nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose 0,5 g L <sup>-1</sup> , 1 g L <sup>-1</sup> e 2 g L <sup>-1</sup> no reator com metil paration, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano..... | 98  |
| Figura 42 | – | Variação de pH nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose 0,5 g L <sup>-1</sup> , 1 g L <sup>-1</sup> e 2 g L <sup>-1</sup> no reator com MP, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.....   | 99  |
| Figura 43 | – | Variação do pH no reator com ATZ, com biomassa imobilizada ao longo do planejamento experimental.....  | 100 |
| Figura 44 | – | Diagrama de Pareto do efeito padronizado em termos de degradação   |     |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
|           | de ATZ.....  | 101 |
| Figura 45 | – Diagrama de Pareto do efeito padronizado em termos de degradação de MP.....                          | 103 |
| Figura 46 | – Variação do pH no reator com MP, com biomassa imobilizada ao longo do planejamento experimental..... | 103 |
| Figura 47 | – Teste de toxicidade com cebolas para os reatores com atrazina e metil paration.....                  | 106 |
| Figura 48 | – Identificação morfológica macroscópica e microscópica da espécie predominante nas amostras.....      | 109 |
| Figura 49 | – Estrutura apresentando a vesícula, fiálides e conídios da espécie isolada.....                       | 110 |
| Figura 50 | – Tamanho dos esporos da espécie isolada.....  | 110 |
| Figura 51 | – Amplificação do DNA depois da PCR.....   | 111 |
| Figura 52 | – Agrupamento da espécie encontrada.....   | 112 |

## LISTA DE TABELAS

|           |   |   |     |
|-----------|---|---|-----|
| Tabela 1  | – | Características do metil paration.....  | 29  |
| Tabela 2  | – | Características da atrazina.....  | 32  |
| Tabela 3  | – | Leis Estaduais do Nordeste do Brasil sobre agrotóxicos.....   | 37  |
| Tabela 4  | – | Constituição de reatores usados nas bateladas aeradas e presença de glicose e metanol.....                                      | 47  |
| Tabela 5  | – | Faixa experimental e níveis dos fatores estudados no planejamento fatorial.....   | 49  |
| Tabela 6  | – | Testes propostos para o planejamento experimental.....  | 50  |
| Tabela 7  | – | Crescimento do diâmetro, em centímetros, da colônia de <i>Aspergillus niger</i> em teste de tolerância com atrazina.....        | 57  |
| Tabela 8  | – | Crescimento do diâmetro, em centímetros, da colônia de <i>Aspergillus niger</i> em teste de tolerância com metil paration.....  | 59  |
| Tabela 9  | – | Percentuais de remoção durante as duas fases de operação das bateladas agitadas, para diferentes tempos de reação (TR).....     | 70  |
| Tabela 10 | – | Velocidade de consumo de ATZ nos reatores em batelada dispersa com presença de metanol e variação de glicose.....               | 73  |
| Tabela 11 | – | Velocidade de consumo de metil paration nos reatores em batelada dispersa com presença de metanol.....                          | 79  |
| Tabela 12 | – | Velocidade de consumo de ATZ nos reatores em batelada dispersa sem presença de metanol e variadas concentrações de glicose..... | 84  |
| Tabela 13 | – | Velocidade de consumo de metil paration nos reatores em batelada dispersa sem presença de metanol.....                          | 89  |
| Tabela 14 | – | Remoção de atrazina nas condições do planejamento experimental.....   | 100 |
| Tabela 15 | – | Remoção de metil paration nas condições do planejamento experimental.....   | 102 |
| Tabela 16 | – | Teste biológico realizado no reator com ATZ no planejamento fatorial para contagem de bactérias e fungos.....                   | 104 |
| Tabela 17 | – | Teste biológico realizado no reator com MP no planejamento fatorial para contagem de bactérias e fungos.....                    | 105 |

|           |   |  |     |
|-----------|---|--|-----|
| Tabela 18 | – | Crescimento das raízes das cebolas utilizadas para o teste de toxicidade com o efluente dos reatores e com o branco (água de abastecimento)..... | 106 |
| Tabela 19 | – | Saturação da ATZ na espuma de poliuretano.....   | 107 |
| Tabela 20 | – | Saturação do MP na espuma de poliuretano.....  | 108 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |   |
|----------|---|
| AChE     | Acetilcolinesterase   |
| ACN      | Acetonitrila  |
| ANVISA   | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                                    |
| ATZ      | Atrazina  |
| CAS      | <i>Chemical Abstracts Service</i>   |
| CLAE     | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                                    |
| CONAMA   | Conselho Nacional do Meio Ambiente  |
| DEA      | Desetilatrazina   |
| DEDIA    | Desetildeisopropilatrazina  |
| DEHA     | Desetilhidroxiatrazina  |
| DIA      | Deisopropilatrazina   |
| DIHA     | Deisopropilhidroxiatrazina  |
| EMPPPO   | <i>European and Mediterranean Plant Protection Organisation</i>             |
| FIFRA    | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais<br>Renováveis |
| IBAMA    | <i>Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act</i>                  |
| IBGE     | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística                             |
| IDA      | Ingestão média diária   |
| LATAM    | Laboratório de Tecnologia Ambiental   |
| LAT      | Laboratório de Análises Traço   |
| MAPA     | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento                         |
| MP       | Metil Paration  |
| PCR      | Reação em Cadeia da Polimerase  |
| RBS      | Reator em bateladas sequenciais   |
| RC       | Reatores controle   |
| RF       | Reatores com fungos   |
| RFA      | Reator com ATZ, fungo   |
| RFGA 0,5 | Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 0,5 g L <sup>-1</sup>    |
| RFGA 1   | Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 1 g L <sup>-1</sup>      |
| RFGA 2   | Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 2 g L <sup>-1</sup>      |

|           |   |
|-----------|---|
| RFGA 3    | Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 3 g L <sup>-1</sup>            |
| RFGA 4    | Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 4 g L <sup>-1</sup>            |
| RFGA 5    | Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 5 g L <sup>-1</sup>            |
| RFGP 0,5  | Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 0,5 g L <sup>-1</sup>           |
| RFGP 1    | Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 1 g L <sup>-1</sup>             |
| RFGP 2    | Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 2 g L <sup>-1</sup>             |
| RFGP 3    | Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 3 g L <sup>-1</sup>             |
| RFGP 4    | Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 4 g L <sup>-1</sup>             |
| RFGP 5    | Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 5 g L <sup>-1</sup>             |
| RFMA      | Reator com ATZ, fungo e metanol   |
| RFMGA 0,5 | Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L <sup>-1</sup> |
| RFMGA 1   | Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L <sup>-1</sup>   |
| RFMGA 2   | Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L <sup>-1</sup>   |
| RFMGA 3   | Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L <sup>-1</sup>   |
| RFMGA 4   | Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L <sup>-1</sup>   |
| RFMGA 5   | Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L <sup>-1</sup>   |
| RFMGP 0,5 | Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L <sup>-1</sup>  |
| RFMGP 1   | Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L <sup>-1</sup>    |
| RFMGP 2   | Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L <sup>-1</sup>    |
| RFMGP 3   | Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L <sup>-1</sup>    |
| RFMGP 4   | Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L <sup>-1</sup>    |
| RFMGP 5   | Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L <sup>-1</sup>    |
| RFP       | Reator com MP e fungo   |
| RFMP      | Reator com MP, fungo e metanol  |
| SEMACE    | Superintendência Estadual do Meio Ambiente do Ceará                               |
| SINDAG    | Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola                  |
| SINITOX   | Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas                             |

## SUMÁRIO

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1      | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 21 |
| 1.1    | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 23 |
| 1.1.1  | <i>Objetivo Geral</i> .....   | 23 |
| 1.1.2  | <i>Objetivos Específicos</i> .....  | 23 |
| 2      | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 25 |
| 2.1    | <b>Agrotóxicos e a problemática ambiental</b> .....                                   | 25 |
| 2.2    | <b>Características do desregulador metil paration</b> .....                           | 28 |
| 2.3    | <b>Características do desregulador Atrazina</b> .....                                 | 30 |
| 2.4    | <b>Agrotóxicos e a saúde pública</b> .....  | 33 |
| 2.5    | <b>Legislação ambiental</b> .....   | 35 |
| 2.6    | <b>Micodegradação</b> .....   | 37 |
| 2.6.1  | <i>Fungos</i> .....   | 37 |
| 2.6.2  | <i>Aplicação da micodegradação</i> .....  | 38 |
| 3      | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 42 |
| 3.1    | <b>Etapa I - Produção da suspensão de esporos fúngicos</b> .....                      | 43 |
| 3.2    | <b>Etapa II - Teste de torelância em placas</b> .....                                 | 44 |
| 3.3    | <b>Etapa III - Batelada em mesa agitadora</b> .....                                   | 45 |
| 3.4    | <b>Etapa IV - Batelada aerada com biomassa dispersa</b> .....                         | 46 |
| 3.5    | <b>Etapa V - Reator em Bateladas Sequenciais (RBS) com biomassa imobilizada</b> ..... | 48 |
| 3.6    | <b>Etapa VI - Planejamento fatorial</b> .....   | 49 |
| 3.7    | <b>Análises realizadas</b> .....  | 50 |
| 3.8    | <b>Etapa VII - Teste biológico</b> .....  | 50 |
| 3.9    | <b>Etapa VIII - Teste de toxicidade com efluente final</b> .....                      | 51 |
| 3.10   | <b>Etapa IX – Teste de saturação na biomassa e no meio suporte</b> .....              | 53 |
| 3.11   | <b>Etapa X – Identificação, caracterização morfológica e molecular</b> .....          | 54 |
| 3.11.1 | <i>Extração do DNA</i> .....  | 54 |
| 3.11.2 | <i>Amplificação do DNA</i> .....  | 55 |
| 3.12   | <b>Análise dos dados</b> .....  | 56 |
| 4      | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 57 |

|                |   |            |
|----------------|---|------------|
| <b>4.1</b>     | <b>Etapa II – Teste de tolerância.....</b>  | <b>57</b>  |
| <b>4.1.1</b>   | <b><i>Atrazina.....</i></b>   | <b>57</b>  |
| <b>4.1.2</b>   | <b><i>Metil paration.....</i></b>   | <b>59</b>  |
| <b>4.2</b>     | <b>Etapa III - Batelada em mesa agitadora.....</b>  | <b>60</b>  |
| <b>4.2.1</b>   | <b><i>Fase 1- Influência do metanol.....</i></b>  | <b>60</b>  |
| <b>4.2.1.1</b> | <b><i>Atrazina.....</i></b>   | <b>60</b>  |
| <b>4.2.1.2</b> | <b><i>Metil paration.....</i></b>   | <b>63</b>  |
| <b>4.2.2</b>   | <b><i>Fase 2 – Sem metanol.....</i></b>   | <b>65</b>  |
| <b>4.2.2.1</b> | <b><i>Atrazina.....</i></b>   | <b>65</b>  |
| <b>4.2.2.2</b> | <b><i>Metil paration.....</i></b>   | <b>67</b>  |
| <b>4.3</b>     | <b>Etapa IV - Batelada aerada com biomassa dispersa.....</b>                              | <b>70</b>  |
| <b>4.3.1</b>   | <b><i>Fase 1 – Influência do metanol com variação da concentração de glicose.....</i></b> | <b>70</b>  |
| <b>4.3.1.1</b> | <b><i>Atrazina.....</i></b>   | <b>70</b>  |
| <b>4.3.1.2</b> | <b><i>Metil paration.....</i></b>   | <b>78</b>  |
| <b>4.3.2</b>   | <b><i>Fase 2 – Ausência do metanol com variações da concentração de glicose .....</i></b> | <b>83</b>  |
| <b>4.3.2.1</b> | <b><i>Atrazina.....</i></b>   | <b>83</b>  |
| <b>4.3.2.2</b> | <b><i>Metil paration.....</i></b>   | <b>87</b>  |
| <b>4.4</b>     | <b>Etapa V - Reator em bateladas sequenciais (RBS).....</b>                               | <b>92</b>  |
| <b>4.4.1</b>   | <b><i>Atrazina.....</i></b>   | <b>91</b>  |
| <b>4.4.2</b>   | <b><i>Metil paration.....</i></b>   | <b>95</b>  |
| <b>4.5</b>     | <b>Etapa VI - Planejamento fatorial.....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>4.5.1</b>   | <b><i>Atrazina.....</i></b>   | <b>98</b>  |
| <b>4.5.2</b>   | <b><i>Metil paration.....</i></b>   | <b>101</b> |
| <b>4.6</b>     | <b>Etapa VII - Teste Biológico.....</b>   | <b>104</b> |
| <b>4.7</b>     | <b>Etapa VIII - Teste de toxicidade com efluente final.....</b>                           | <b>105</b> |
| <b>4.8</b>     | <b>Etapa IX - Teste de saturação na biomassa e no meio suporte.....</b>                   | <b>107</b> |
| <b>4.9</b>     | <b>Etapa X – Identificação, caracterização morfológica e molecular.....</b>               | <b>108</b> |
| <b>5</b>       | <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>113</b> |
| <b>6</b>       | <b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>  | <b>115</b> |
|                | <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>116</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A exploração dos recursos naturais não diminuiu mesmo diante de muitas iniciativas para coibi-las, como as conferências sobre a questão ambiental. Assim, a degradação do ambiente continua a ser um enorme desafio para as novas tecnologias, e a natureza está, a cada dia, com sua capacidade de resiliência modificada negativamente (PARSHILOV; WOODLING; SUTHERLAND, 2015).

A água, considerada como recurso finito e dotada de valor econômico (BRASIL, 1988) é um dos recursos mais afetados pela busca desenfreada de ganhos econômicos (LONDRES, 2011). Exemplos são os mananciais urbanos, os quais são diariamente contaminados com esgotos domésticos e industriais, que não têm tratamento adequado e são destinados nos corpos hídricos mais próximos.

Dentre os variados tipos de poluição, a gerada por efluentes industriais torna-se uma das mais problemática, pois esses esgotos possuem alta carga de compostos xenobióticos, que muitas vezes, são tóxicos para a microbiota aquática (VON SPERLING, 2005; TEBBOUCHE *et al.*, 2015). Exemplos de substâncias persistentes são os agrotóxicos, que possuem toxicidade comprovada tanto para o ambiente quanto para o homem (GORZA, 2012).

Segundo Carneiro *et al.* (2015), os principais agrotóxicos produzidos no Brasil são os herbicidas, com 45% de representatividade na comercialização desses produtos. Os inseticidas estão em terceiro lugar, com 12%. Nesse contexto, o metil paration, inseticida organofosforado, largamente utilizado nas lavouras brasileiras de algodão, alho, arroz, batata, cebola, feijão, milho, soja e trigo, é classificado pela ANVISA<sup>1</sup>, em termos de toxicidade, como classe I, extremamente tóxico, e seu uso depende de autorização prévia. Sua problemática ambiental está relacionada à inibição da enzima acetilcolinesterase, a qual permite acúmulo de acetilcolina, um neurotransmissor que age no sistema nervoso central. Esse acúmulo pode levar o homem à morte por falência respiratória (KRISTOFF *et al.*, 2011).

No tocante à atrazina, herbicida muito utilizado no Brasil, a maior preocupação é com sua persistência no ambiente. Ela é classificada como classe III (medianamente tóxica)

---

<sup>1</sup> Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/P03%2B%2BParationa-met%25C3%25ADlica.pdf/7edd5934-0e95-44e4-bf70-596b2a884621>. Acesso em 12/08/2016.

segundo a classificação da ANVISA<sup>2</sup>, e seu uso está nas lavouras de abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal e sorgo.

A atrazina possui baixa reatividade e solubilidade, sendo encontrada com facilidade em solos, rios e águas subterrâneas (VONBERG *et al.*, 2014). É importante ressaltar que, de acordo com Oliveira *et al.* (2013), a atrazina, assim como o metil paration, podem ser considerados como desreguladores endócrinos, pois a exposição continuada destes compostos leva a câncer e más formações congênitas.

Almejando diminuir o impacto desses compostos no ambiente, muitos tratamentos vêm sendo desenvolvidos para remover pesticidas dos efluentes gerados durante sua fabricação, como a fitorremediação e a bioremediação (LATIFI *et al.*, 2012).

Destarte, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que visem à remoção de poluentes persistentes em termos de aplicação industrial. Os tratamentos biológicos são usados amplamente, e estão baseados na capacidade dos micro-organismos conseguirem utilizar a matéria orgânica como fonte de energia para o seu crescimento (VON SPERLING, 2005).

Os micro-organismos mais utilizados são as bactérias, as quais possuem arcabouço metodológico consolidado desde o século XX. No entanto, inúmeros estudos também indicam a gama de possibilidades para a aplicação de fungos, pois esses são decompositores primários, suportam condições desfavoráveis de crescimento e possuem melhores respostas quando expostos a substâncias consideradas tóxicas para bactérias (TORTORA *et al.*, 2012).

Vários trabalhos utilizando a micodegradação indicam a capacidade dos fungos de metabolizar compostos alóctones ao ambiente natural, por exemplo, Pereira (2011) concluiu que *Pleurotus ostreatus* UFLA foi capaz de metabolizar 63% de atrazina em meio aquoso. Kist (2013), utilizando as espécies *Pleurotus ostreatus* POS 560 e *Pleurotus floridae* PSP 1 para remoção de 2,4,6-trinitrotolueno – TNT em meio líquido, conseguiu remoções de 100% do poluente. Silva (2013) estudou a remoção de clorpirifós, metil paration e profenós em meio líquido com os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* e conseguiu remoção de 72% de clorpirifós com a espécie *A. sydowii* CBMAIA 935, 100% de metil paration, com *A.*

---

<sup>2</sup>Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/a14.pdf/76773817-be41-4334-9846-77bd559f9e80> Acesso em 12/08/2016.

*sydowii* CBMAIA 935 e *P. decaturense* e 100% de profenós com a espécie *A. sydowii* CBMAIA 935.

Diante de resultados expressivos apresentados e buscando alternativas viáveis para o tratamento de efluentes recalcitrantes, o presente estudo objetivou avaliar a capacidade da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 de mineralizar os pesticidas atrazina e metil paration, em solução.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo Geral

Verificar a capacidade da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400 de degradar os agrotóxicos metil paration e atrazina de matriz aquosa em reatores de bancada.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a tolerância dos pesticidas metil paration e atrazina em teste em placas, nas concentrações de 5 mg L<sup>-1</sup>, 10 mg L<sup>-1</sup>, 20 mg L<sup>-1</sup>, 30 mg L<sup>-1</sup> e 50 mg L<sup>-1</sup> frente ao *Aspergillus niger* AN 400;
- Avaliar a influência da agitação rotacional na degradação dos pesticidas atrazina e metil paration em mesa agitadora sob 80 rpm e 150 rpm, inoculados com *Aspergillus niger* AN 400;
- Verificar o potencial do metanol como cossustrato na degradação dos pesticidas atrazina e metil paration em reatores em bateladas inoculados com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400, sob rotação orbital de 80 rpm e de 150 rpm e nos reatores com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 em batelada aerada;
- Investigar a influência da adição de glicose como cosustrato, nas concentrações 0,5 g L<sup>-1</sup>, 1 g L<sup>-1</sup>, 2 g L<sup>-1</sup>, 3 g L<sup>-1</sup>, 4 g L<sup>-1</sup> e 5 g L<sup>-1</sup>, na degradação de metil paration e de atrazina com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 em batelada aerada;

- Avaliar a influência da glicose ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$ ,  $2 \text{ g L}^{-1}$ ) na degradação de atrazina e metil paration em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada;
- Verificar a toxicidade do efluente final dos reatores com ATZ e MP em teste de toxicidade com cebolas;
- Investigar, a nível molecular, qual espécie fúngica presente nos reatores em estudo.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Agrotóxicos e a problemática ambiental**

A utilização dos defensivos agrícolas foi intensificada a partir da chamada Revolução Verde, iniciada no final de 1940, nos EUA, e em meados de 1960 no Brasil, com a criação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA). Essa revolução trouxe novas políticas agrícolas que buscavam a modernização da agricultura, tendo como meios para tal fim o uso de agroquímicos e de insumos de origem industrial, o que proporcionou aumento expressivo no uso de agrotóxicos (LIMA; AZEVEDO, 2013).

O PNDA estimulou o envolvimento dos setores econômicos brasileiros com a produção em larga escala dos agrotóxicos e os produtores rurais, que foram pressionados pela nova política, que atrelava à concessão de crédito rural à compra de agrotóxicos (SILVA; BOTELHO, 2014). É interessante mencionar que o contexto social desse período estava marcado pela falta de regulamentação de políticas sociais, em especial, pela pequena cobertura da seguridade social, além da baixa taxa de alfabetização dos trabalhadores, situação que os deixavam ainda mais susceptíveis às consequências negativas do uso de pesticidas.

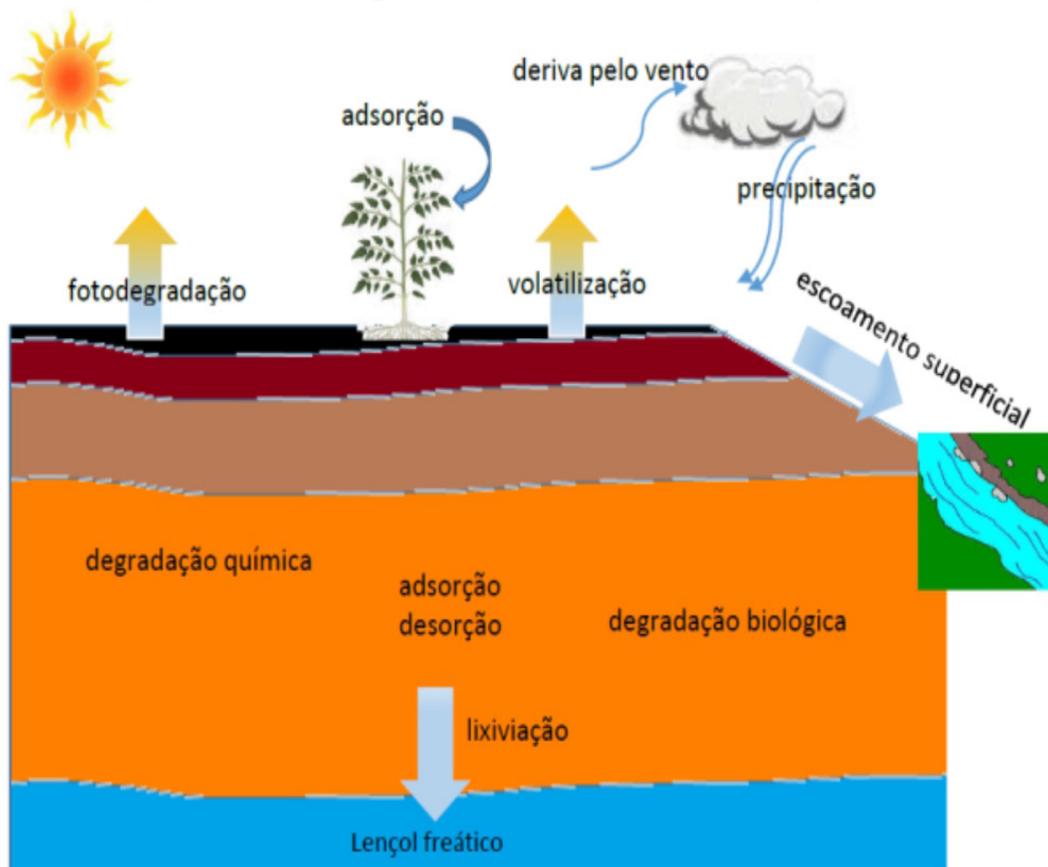
O estímulo do crescimento do mercado agroindustrial foi resultado da crescente pressão demográfica dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, que precisavam aumentar a produção agrícola para conseguir suprir a crescente demanda de alimentos da população que aumentara de forma exponencial (SILVA; BOTELHO, 2014). Esse aumento no consumo de agrotóxicos trouxe à tona a problemática que essas substâncias podem oferecer ao meio ambiente, visto que milhões de toneladas são utilizadas anualmente. No entanto, apenas uma pequena porção atinge efetivamente os organismos alvo, sendo o restante depositado nos solos, águas superficiais e subterrâneas, contaminando assim o meio ambiente (KIST, 2013).

Muitos agrotóxicos são considerados compostos recalcitrantes, e ficam na natureza por longos períodos, sem que a microbiota autóctone consiga metabolizá-los, ocorrendo processos que afetam seus destinos ambientais, como fotodegradação, escoamento superficial, degradação biológica e volatilização (Figura 1).

O escoamento superficial gerado em locais com presença de agrotóxicos pode levar à contaminação de mananciais próximos, como açudes de abastecimento público, além de rios e lagoas. A lixiviação levará o composto pelo perfil do solo, acarretando contaminação

de lençóis freáticos da região. Isso poderá ocorrer principalmente se o pesticida for xenobiótico, pois os micro-organismos presentes no ambiente podem não conseguir metabolizá-lo, o que culminará com sua entrada nos recursos hídricos mais próximos.

Figura 1 - Processos que afetam o destino ambiental dos agrotóxicos.



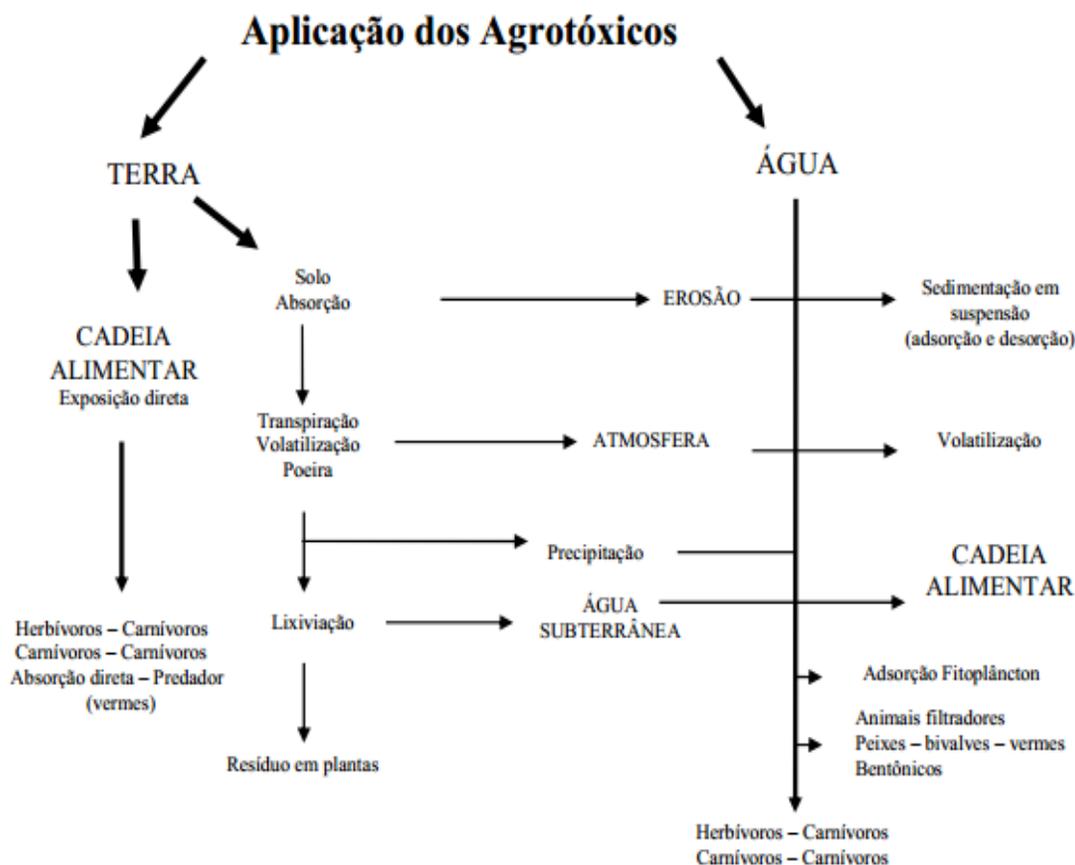
Fonte: Rebelo; Caldas (2014).

Desta forma, em síntese, observa-se que o processo de dissipação do pesticida no meio ambiente ocorre inicialmente por meio da aplicação, e através da ação do vento, onde o composto é deslocado para o local da cultura (processo chamado de deriva). Do local de sua aplicação até o agrotóxico chegar ao solo, há a absorção por parte das plantas, volatilização e degradação através de fatores abióticos (temperatura, incidência de raios ultra-violeta), até que quando ele chega ao solo, inicia-se o processo de degradação pelos micro-organismos presentes no solo, ao passo que o que não é utilizado pela microbiota tende a percolar para os lençóis freáticos, o que termina por contaminá-los (BARBOSA, 2013).

Ao se tratar de poluição pelos agrotóxicos, na Figura 2 está representado o que pode ocorrer quando efluentes de indústrias de fabricação de agrotóxicos são lançados sem tratamento no meio ambiente.

Quando chegam na natureza, de acordo com seu nível de recalcitrância, podem se agregar nos materiais que estão no sedimento, ser metabolizados pelos micro-organismos presentes no meio, ou adsorverem-se às plantas aquáticas, além de poder ocorrer a magnificação trófica (PAWLOWSKY *et al.*, 1997).

Figura 2 – Movimento dos agrotóxicos no ambiente por caminhos abióticos e bióticos.



Fonte: Hayes; Laws (1997).

Ainda segundo Pawlowsky *et al.* (1997), o tratamento dos efluentes das indústrias de defensivos agrícolas é complexo, pois os processos que ocorrem na fabricação dos produtos variam de acordo com a instalação da indústria e com o princípio ativo dos agrotóxicos produzidos. Além disso, Latifi *et al.* (2012) relataram que os tratamentos usuais para os referidos efluentes são onerosos, a saber tratamento químico, incineração e disposição em

aterros sanitários. Para Pawlowsky *et al.* (1997), o que dificulta ainda mais o tratamento desses resíduos é a existência de princípios ativos, solventes, e subprodutos intermediários, pois tornam o efluente mais tóxico ao tratamento biológico.

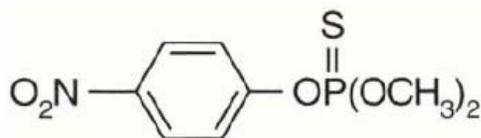
Nesse sentido, o potencial de impacto negativo do meio ambiente pela presença em demasia de agrotóxicos/pesticidas/defensivos agrícolas, retrata a necessidade de medidas que mitiguem o lançamento desses produtos nas águas e solos.

## 2.2 Características do desregulador metil paration

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, modo de ação em organismos alvo, quanto aos efeitos que causam a saúde do homem, pela avaliação da neurotoxicidade, dentre outros (SAVOY, 2011).

Com relação à sua estrutura química, o metil paration (MP) é considerado um organofosforado, pois, assim como os agrotóxicos da referida classe, é derivado do ácido fosfórico, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (PETRONILHO; FIGUEROA-VILLAR, 2014). A fórmula estrutural do MP está apresentada na Figura 3.

Figura 3 – Fórmula estrutural do metil paration.



Fonte: Nota técnica ANVISA (2014).<sup>3</sup>

O MP tornou-se importante na agricultura porque substituiu o paration, pesticida mais tóxico e banido em muitos países, sendo que um de seus maiores problemas era a alta toxicidade em mamíferos, fato que o levou a ser classificado como agrotóxico de uso restrito nos EUA, pela *Environmental Protection Agency* – EPA (SILVA, 2013).

O metil paration, quando é aplicado nas lavouras, ele também atinge espécies que não são alvo, o que acarreta mortandade dos organismos que estão em equilíbrio com o

<sup>3</sup> Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/96b246804f309971be99bec88f4b6a31/Nota+t%C3%A9cnica+da+Parationa+Met%C3%ADlica.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 02/08/2014.

ecossistema em que o pesticida é lançado, alterando dessa forma o ambiente. Suas principais características estão compiladas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características do metil paration.

| Características                                 | Pesticida                                     |
|---|---|
| Ingrediente ativo ou nome comum                 | PARATIONA-METÍLICA (parathion methyl)         |
| Nº CAS <sup>4</sup>                             | 298-00-0                                      |
| Nome químico                                    | O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate |
| Fórmula bruta/ empírica                         | $C_8H_{10}NO_5PS$                             |
| Grupo químico                                   | organofosforado.                              |
| Classificação toxicológica                      | Classe I (extremamente tóxico)                |
| Classe Agronômica                               | inseticida e acaricida                        |
| Peso molecular                                  | 263,23 g mol <sup>-1</sup>                    |
| Coefficiente de partição (log K <sub>ow</sub> ) | 3   |
| Solubilidade em água (25 °C)                    | 55-60 mg L <sup>-1</sup>                      |
| IDA <sup>5</sup>                                | 0,003 mg/kg/peso corpóreo                     |

Fonte: Elaboração própria com dados da ANVISA, 2016.

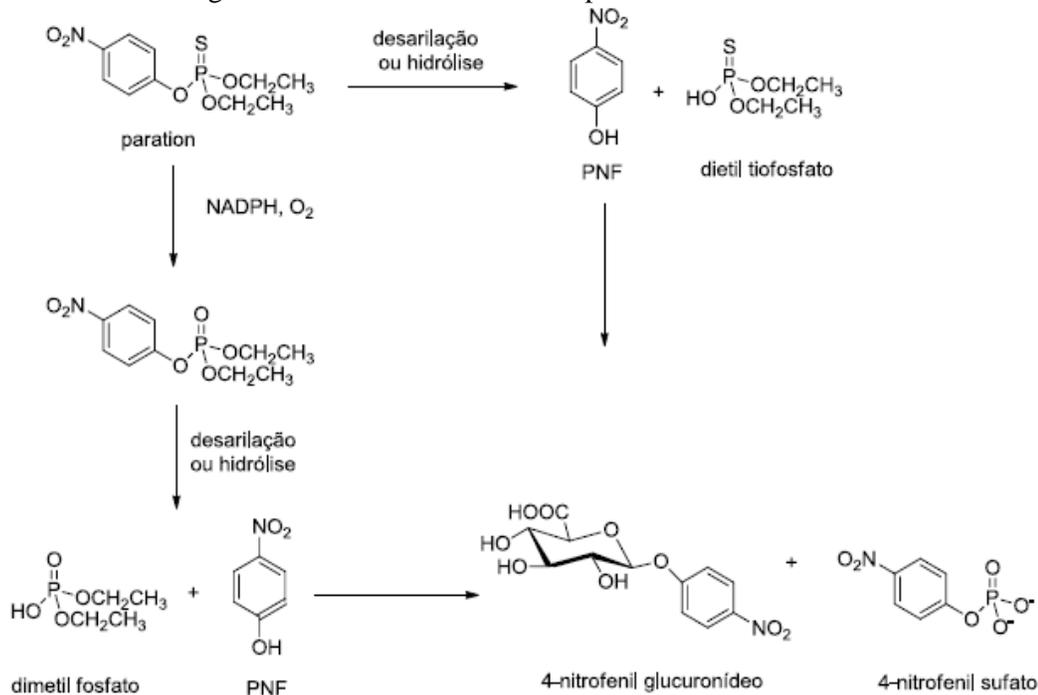
Barr *et al.* (2002) relataram que após a absorção do MP no corpo humano, pode haver conversão dele por fotodegradação a seu estado mais perigoso/tóxico, o paroxon, e quando esta forma está presente no organismo humano ela pode resultar em excreção urinária contendo fenol livre, conforme apresentado na Figura 4.

Nos EUA os organofosforados foram banidos desde 1970, com base na sua capacidade de afetar a enzima responsável pelo controle da transmissão dos impulsos nervosos, acetilcolinesterase (AChE), de forma irreversível, o que compromete o sistema nervoso central, sendo considerados por isso, desreguladores endócrinos (PETRONILO; FIGUEROA-VILLAR, 2014).

<sup>4</sup> Chemical Abstract Service

<sup>5</sup> Ingestão diária aceitável

Figura 4 – Metabolismo do metil paration em humanos.



Fonte: Barr *et al.* (2002).

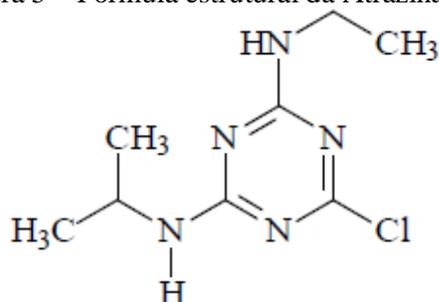
Outro exemplo é a descoberta feita por Salles *et al.* (2002) de que a atividade da serotonina e da melatonina pode ser afetada pelo MP. Os autores estudaram a injeção de 20 mg/kg de peso corporal de metil paration em pacus. O MP é muito usado na piscicultura para combate de artropodes que predem alevinos nos tanques de cultivo. Passadas 24 h após ser injetado na cavidade peritonial dos pacus, o metil-paration aumentou a atividade da enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) em cerca de 35%, mas inibiu a serotonina N-acetiltransferase (SNAT), que chegou a apresentar 90% de sua atividade inibida 48h depois da injeção.

### 2.3 Características do desregulador atrazina

O herbicida atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um agrotóxico seletivo, usado amplamente no Brasil (BARBOSA, 2013). Na Figura 5 está apresentada sua fórmula estrutural. Sua ação baseia-se no bloqueio da fotossíntese de plantas consideradas invasoras, o que provoca desequilíbrio no ambiente, gerado pelo declínio de

plantas sensíveis em ecossistemas hídricos localizados no entorno de pontos de contaminação (LEME, 2010).

Figura 5 – Fórmula estrutural da Atrazina.



Fonte: Leme (2010).

A parcela de atrazina - ATZ que consegue ser degradada no solo ou nas águas pelos micro-organismos, geralmente não é mineralizada por completo, sendo principais produtos de degradação da atrazina compostos hidroxilados e clorados, como Desetilatrizona (DEA), Deisopropilatrizona (DIA), Desetildeisopropilatrizona (DEDIA), Desetilhidroxilatrizona (DEHA), Deisopropilhidroxilatrizona (DIHA) e Hidroxilatrizona (HA), menos tóxicos que a ATZ; no entanto, ainda apresentando grau de toxicidade (COELHO; DI BERNARDO, 2012).

Se a ATZ e/ou seus produtos de degradação chegarem aos corpos d'água superficiais de abastecimento, como os mesmos não podem ser removidos por tratamentos convencionais (coagulação, floculação, sedimentação), terminam por bioacumular, visto que seu coeficiente de partição octanol-água, é de 2,70 (COELHO; DI BERNARDO, 2012), o qual representa a baixa solubilidade da ATZ na água.

Além da problemática da bioacumulação do referido herbicida, o contato direto de ATZ com o homem pode levar a doenças degenerativas, como alta incidência de câncer e defeitos congênitos, visto que sua meia-vida é de um mês e meio a cinco anos (SÁNCHEZ *et al.*, 2013). Em acordo com a preocupação dos autores citados, estudo realizado na Alemanha, em seus aquíferos, Vonberg *et al.* (2014) observaram que a atrazina e seus subprodutos permaneceram mais de vinte anos na água, fato observado em locais próximos a campos de agricultura, principal via de introdução da atrazina no ambiente.

De acordo com suas características de alteração em seres vivos, a atrazina também é considerada como disruptor endócrino, pois tem possíveis efeitos cancerígenos e pode estar

associada à diminuição de espermatozoides em homens (BESSAC; HOYAU, 2011). Em 1991, teve seu uso proibido na Alemanha, em virtude da contaminação dos mananciais de abastecimento para o consumo humano, conforme relataram Vonberg *et al.* (2014). Com o passar do tempo e da percepção dos riscos que o uso da ATZ poderia trazer, em 2004, seu uso também foi proibido na União Européia. No Brasil, no entanto, ele ainda tem sido utilizado assim como em mais de 80 países, sendo um dos herbicidas mais empregados no mundo (BESSAC; HOYAU, 2011). Na Tabela 2 estão apresentadas as características da atrazina.

Tabela 2 – Características da atrazina.

| <b>Características</b>                                 | <b>Pesticida</b>   |
|--|--|
| Ingrediente ativo ou nome comum<br>Nº CAS <sup>2</sup> | Atrazina<br>1912-24-9  |
| Nome químico   | 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina              |
| Fórmula bruta/ empírica                                | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> C <sub>1</sub> N <sub>5</sub> |
| Grupo químico  | Triazina/organoclorado                                       |
| Classificação toxicológica                             | Classe III (medianamente tóxico)                             |
| Classe Agronômica                                      | Herbicida  |
| Peso molecular   | 215,69 g mol <sup>-1</sup>                                   |
| Coefficiente de partição (log K <sub>ow</sub> )        | 2,70   |
| Solubilidade em água (27 °C)                           | 33 mg L <sup>-1</sup>  |

Fonte: Elaboração da autora, 2016.

O uso da ATZ cresce de forma preocupante no Brasil. Em 2009, por exemplo, esteve entre os dez princípios ativos mais utilizados (SEADE, 2013). Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola - SINDAG (2009), sobre comercialização de agrotóxicos no Brasil, em 2009, a produção foi de 725 mil toneladas de produtos formulados, com os herbicidas representando 59% (429.693 toneladas). Seu uso é principalmente nas lavouras de cana de açúcar, conforme já relatavam ARMAS *et al.* (2005). Atualmente continua a ser usada largamente, principalmente com a expansão da área plantada, conforme dados da safra 2015/2016 disponibilizados pela Companhia Nacional de

Abastecimento – Conab<sup>6</sup>, os quais apontam para a produção de 658,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Esse valor é 3,8% maior em relação a safra 2013/2014. A Conab indicou ainda que área destinada a produção sucroalcooleira será de aproximadamente 8.995,5 mil hectares para a safra 2015/2016.

## 2.4 Agrotóxicos e a saúde pública

Embora um grande número de pesticidas tenha sido descoberto no início do século XX, seus efeitos deletérios foram relatados somente a partir de 1932 (KORBES *et al.*, 2010). O uso contínuo e sem responsabilidade dos agrotóxicos tem culminado com a contaminação dos recursos naturais e das pessoas que lidam cotidianamente com a exposição aos produtos, como assinalou KRISTOFF *et al.* (2011). De acordo com Londres (2011),

“As pessoas mais expostas aos perigos da contaminação pelos agrotóxicos são aquelas que têm contato com eles no campo. Há os aplicadores, preparadores de caldas e responsáveis por depósitos, que têm contato direto com os produtos, e há também os trabalhadores que têm contato indireto com os venenos ao realizar capinas, roçadas, colheitas etc. Este segundo grupo é, na verdade, o de maior risco, uma vez que o intervalo de reentrada nas lavouras não costuma ser respeitado e estes trabalhadores não usam proteção.”

Para ratificar o que Londres (2011) sugeriu, dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) – Ministério da Saúde/FIOCRUZ, em 1999, confirmaram notificação de 4.674 intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola. Em 2011, último ano de divulgação dos dados do SINITOX, foram 5.075 casos registrados no país, com maiores incidências no sudeste e sul (SINITOX, 2011). É relevante salientar que esses números podem não representar a realidade, visto que o número real de intoxicações é muito maior – a própria Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que, para cada caso registrado de intoxicação pelos agrotóxicos, há 50 não notificados (LONDRES, 2011).

Os efeitos negativos oriundos da exposição aos agrotóxicos à saúde humana, dependerão principalmente do perfil toxicológico do produto, assim como da intensidade e exposição realizada, podendo a referida exposição dar-se através da inalação, ingestão e contato com a pele, resultando em problemas de saúde agudos e crônicos (PEREIRA, 2011).

---

<sup>6</sup> Disponível em:

[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_03\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf). Acesso em 12/08/2016

O incremento de casos de esterilidade de homens e mulheres, disfunções endócrinas, casos de câncer, disfunções renais e neurológicas têm sido atribuídos aos defensivos agrícolas (ABHILASH; SINGH, 2009). Por exemplo, Oliveira *et al.*(2014) concluíram que os agroquímicos podem passar de mãe para filho através da amamentação, quando as mães forem expostas no período pós-fecundação (primeiro trimestre gestacional) e no período total, representado pela soma dos três meses antes da fecundação e o primeiro trimestre gestacional, o que poderá trazer malformações congênitas para os bebês.

No Brasil, a preocupação com as relações de padrões estabelecidos entre meio ambiente e saúde está crescendo, especialmente na área de saúde coletiva, com inclusão, por exemplo da chamada saúde ambiental, o que terminou por aproximar o meio acadêmico da área de saúde com a área ambiental (BEDOR, 2008).

O Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, elaborado pela Organização Pan-Americana da Saúde exemplifica a relação entre saúde e meio ambiente de forma relevante. Há, no manual, definição das intoxicações por agrotóxicos em aguda, subaguda e crônica. Por exemplo, se a exposição é única ou por curto período de tempo, o indivíduo pode apresentar tontura, náusea, vômito, desorientação, dificuldade respiratória, coma, outras ou morte, quando ela for aguda, e subaguda quando apresentar sonolências, fraquezas com dor de cabeça e de estômago e mal-estar e outras. Caso a exposição seja por longo período de tempo, poderá apresentar cânceres, paralisias, esterilidade masculina entre outras (OPS, 1997).

Matos (2013) investigou a incidência de casos de intoxicação exógena por agrotóxicos no Brasil de 2007 a 2012 e constatou que:

“[...] os casos de intoxicações e de óbitos por agrotóxicos têm aumentado nos últimos anos, no Brasil. A média da taxa de incidência foi de 0,459 e a taxa de letalidade de 5,2 por 100.000 hab. Os valores indicam uma situação preocupante, haja vista que muitas pessoas ainda se encontram sob risco de contaminação e morte por esses produtos. Os estados com maior percentual de casos confirmados de intoxicações no SINAN foram o Estado de São Paulo com 19%, seguido pelo Paraná com 18%, Minas Gerais com 14% e Pernambuco com 8%; [...] na zona rural os principais fatores envolvidos podem ser a maior frequência e tempo de exposição aos agrotóxicos, dificuldade de acesso aos serviços de saúde e menor nível de escolaridade e ausência de uso de EPIs.” .

É necessário então, que a fiscalização seja intensificada sobre o uso de agrotóxicos, assim como acompanhada sua relação com o aumento de casos de intoxicação e de alterações na saúde de homens que são expostos aos pesticidas.

## 2.5 Legislação ambiental

A consolidação da legislação ambiental no Brasil ocorreu principalmente a partir da promulgação da Constituição Federal de 1988. No entanto, outros marcos regulatórios foram registrados a partir do código das Águas, Decreto 24.643/1934, da Política Nacional de Meio Ambiente, lei 6938/1981, e a criação do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA em 1981. Esse aparato legal foi vagarosamente sendo implementado. Hoje, o Brasil é conhecido como um país que possui boas leis, mas não consegue colocá-las em prática de fato, devendo-se à falta de fiscalização dos órgãos competentes (FRANCO, 2014). Em se tratando de agrotóxicos, um marco legal para fiscalização de agrotóxicos foi estabelecida pela lei 7802/1989<sup>7</sup>, na qual consta a seguinte definição para agrotóxicos:

“os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (BRASIL, 1989).

A referida lei nº 7802/1989 e o decreto nº 24.114/1934 são marcos que estabeleceram a regulamentação do uso, produção e comercialização dos agrotóxicos no Brasil. Hoje o órgão responsável pela fiscalização e registro de pesticidas é Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), além do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com auxílio do monitoramento dos produtos, em termos de questão agrônômica, e a ANVISA auxilia avaliando a toxicidade dos agrotóxicos na saúde humana. Ainda sob o campo federal, a resolução CONAMA nº 334/2003 “dispõe sobre os procedimentos de licenciamento ambiental de estabelecimentos destinados ao recebimento de embalagens vazias de agrotóxicos”.

Nos Estados Unidos, por exemplo, a *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act*, (FIFRA) controla todos os aspectos relativos à utilização, comercialização, venda dos agrotóxicos, além de ter padrão de avaliação de riscos da utilização dos produtos. Países como Canadá, Austrália e Japão também possuem regulamentação própria e avaliam o

---

<sup>7</sup> Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

risco do uso desses produtos. Já na Europa, a agência que regulamenta os usos (*European and Mediterranean Plant Protection Organisation*) tem procedimentos mais flexíveis, podendo ser adaptados de acordo com cada país membro (REBELO; CALDAS, 2014).

Em termos de legislação estadual no Brasil, observa-se que a maioria dos estados já possui leis. Em especial no Nordeste, todos já possuem, como pode ser visualizado na Tabela 3. Alagoas despontou como primeiro do Nordeste a legislar, enquanto que o Ceará figura em terceiro lugar, juntamente com a Bahia.

As leis apresentadas na Tabela 3 demonstram a preocupação dos governos com a utilização/comercialização dos agrotóxicos, fato corroborado com os limites estabelecidos em termos de qualidade de água e lançamento de efluentes.

Por exemplo, a resolução CONAMA n° 357/2005, alterada pelas resoluções 410/2009 e 430/2011 (BRASIL, 2005; 2009; 2011), estipula limite máximo permitido de atrazina em águas doces, que é  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , além disso, determina ainda que efluentes de qualquer fonte poluidora só poderão ser lançados nos corpos de água, após o devido tratamento e o mesmo não deverá causar ou possuir potencial para propiciar efeitos tóxicos. Para metil paration, os valores máximos de concentração são 0,04, 35 e  $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, para águas doces classe I, III e águas salobras classe I.

No tocante a potabilidade de água, a Portaria do Ministério da Saúde (MS) 2914/11 estabeleceu concentração máxima permitida para o metil paration de  $9 \mu\text{g L}^{-1}$  e de atrazina  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (assim como na Resolução 357/2005 do CONAMA). Nos EUA o limite para pesticidas em águas de abastecimento é de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (USEPA), e de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  na Comunidade Européia.

Tabela 3 – Leis Estaduais do Nordeste do Brasil sobre agrotóxicos.

| <b>Estado</b> | <b>Nº da lei</b> | <b>Conteúdo</b>  |
|---------------|------------------|--|
| AL            | 5.852/1986       | Dispõe sobre a utilização, a produção, o comércio, o armazenamento, transporte interno e a fiscalização do uso de agrotóxicos seus componentes e afins e dá outras providências  |
| SE            | 3.195/1992       | Dispõe sobre o controle de Agrotóxicos e outros biocidas, a Nível estadual, e dá providências correlatas.  |
| CE            | 12.228/1993      | Dispõe sobre o uso, a produção, o consumo, o comércio e o armazenamento dos agrotóxicos, seus componentes e afins bem como sobre a fiscalização do uso de consumo do comércio, do armazenamento e do transporte interno desses produtos.   |
| BA            | 6.455/1993       | Dispõe sobre o controle da produção, da comercialização, do Uso, do consumo, do transporte e armazenamento de Agrotóxicos, seus componentes e afins no território do Estado Da Bahia e dá outras providências.   |
| PE            | 12.753/2005      | Dispõe sobre o comércio, o transporte, o armazenamento, o uso e aplicação, o destino final dos resíduos e embalagens vazias, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, bem como o monitoramento de seus resíduos em produtos vegetais, e dá outras providências. |
| RN            | 8.672/2005       | Dispõe sobre o controle da produção, comércio, uso, Armazenamento, transporte interno e o destino final de Embalagens e resíduos de agrotóxicos, seus componentes e Afins, no Estado do Rio Grande do Norte, e dá outras Providências.   |
| MA            | 8.521/2006       | Dispõe sobre a produção, o transporte, o Armazenamento, a comercialização, a utilização, O destino final dos resíduos e embalagens Vazias, o controle, a inspeção e a Fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, no Estado do Maranhão, e Dá outras providências.                            |
| PI            | 5.626/2006       | Dispõe sobre o controle de agrotóxicos seus componentes e afins no Estado do Piauí, e dá outras providências.  |
| PB            | 9.007/2009       | Dispõe sobre o comércio, o transporte, Armazenamento, o uso e aplicação, o destino Final dos resíduos e embalagens vazias, o Controle, a inspeção e a fiscalização de Agrotóxicos, seus componentes e afins, bem Como o monitoramento de seus resíduos em Produtos vegetais, e dá outras providências.   |

Fonte: Autora, 2016.

## **2.6 Micodegradação**

### **2.6.1 Fungos**

Os micro-organismos contribuem de modo essencial para o equilíbrio dos organismos vivos e elementos químicos do ambiente. Sua aplicação varia desde a síntese de vitaminas, drogas, alcoóis até enzimas utilizadas comercialmente. Na indústria alimentícia,

por exemplo, observa-se a preservação de pickles, manteiga, molho de soja, queijos, através de compostos produzidos pelos micro-organismos (TORTORA *et al.*, 2012).

Os fungos, atualmente estão classificados no domínio Eucaria, e reino fungi, segundo Tortora *et al.* (2012). São seres capazes de habitar os mais diversos lugares, com condições em que outros seres provavelmente não conseguiriam, como em ambientes de ampla variação de pH, faixa em torno de 1,5 a 11; para os filamentosos, os fungos leveduriformes só sobrevivem em ambientes ácidos (LUNA, 2013). Também são conhecidos por sobreviver em baixas concentrações de nutrientes e matéria orgânica (REINEHR *et al.*, 2014).

Em termos de características gerais são heterótrofos, eucariotos, uni ou multicelulares, com reprodução sexuada ou assexuada, e a maioria é aeróbio obrigatório, sendo apenas algumas leveduras fermentadoras, como a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada na fermentação de pão e cerveja (MADIGAN, 2010).

Sua nutrição ocorre por meio de absorção de soluções de matéria orgânica presente no meio. Na presença de oxigênio, a via da hexose monofosfato é a responsável por 30% da quebra da glicose, sendo realizada através de enzimas como manganês peroxidases, lipases, lacases, amilases, que hidrolisam o substrato deixando-o assimilável (REINEHR *et al.*, 2014). Sua preferência são por carboidratos simples como glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos (SARDROOD; GOLTAPPEH; VARMA, 2014).

### **2.6.2 Aplicação da micodegradação**

A biorremediação é uma tecnologia para tratamento de ambientes contaminados usando seres vivos (micro-organismos e plantas) para degradação de poluentes no meio ambiente (SANCHÉZ *et al.*, 2013). Um tipo de biorremediação é a micodegradação, que de acordo com Ramadevi *et al.* (2012), pode envolver três principais processos: a degradação do poluente alvo, a adsorção e a absorção. O primeiro refere-se a utilização do poluente pelo microrganismo, a quebra das ligações do composto. A adsorção é representada pela transferência física do poluente do meio para o fungo, sem sua utilização direta, e pode ocorrer com a biomassa viva ou morta. Já a absorção é o uso do composto alvo nos mecanismos de obtenção de energia do micro-organismo.

Com especial atenção, os fungos filamentosos possuem algumas características úteis para sua aplicação na micorremediação. São mais atrativos quando comparados às

bactérias, pois podem se desenvolver em condições de estresse ambiental, além da vantagem de utilizar suas hifas para obter colonização de grandes áreas em direção a fonte de carbono. Essas diferenciações os deixam com maior contato com o poluente alvo, permitindo assim aumento da biodisponibilidade e da degradação (SARDROOD; GOLTAPPEH; VARMA, 2014).

O uso de fungos data do fim do século XX, sendo os primeiros trabalhos com o uso de *Polyporus versicolor* para degradação de efluente Kraft por Marton, Stern e Marton (1969), *Saccharomyces cerevisiae* para remoção de lindano e dieldrin por Nobles em (1975) e depois, por Khindaria *et al.* (1975), os quais estudaram a degradação de heptacloro por fungos do gênero *Aspergillus*.

O interesse pela micologia baseia-se na capacidade dos fungos de degradar diversos compostos persistentes, a saber: pesticida organofosforado, compostos nitro aromáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e corantes têxteis (RODRIGUES, 2013; KIST, 2013; MARCIAL *et al.*, 2006; ARAÚJO, 2010; LOPES *et al.*, 2014), desobstrução de poços de petróleo, adsorção de metais pesados, lixiviação de minerais e recuperação de solos contaminados (SOARES *et al.*, 2011).

Para More *et al.* (2010) as espécies fúngicas filamentosas são muito utilizadas em tratamentos de efluentes devido a sua característica de promover a biofloculação simultânea de suas hifas, o que faz com que compostos considerados tóxicos possam ser degradados do meio. Zanin *et al.* (2014), por exemplo, utilizaram a espécie filamentosa *Aspergillus flavus* para degradação de fenóis advindos de efluentes de postos de gasolina. Os autores removeram 6,7 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico do efluente estudado, do total de 10 mg L<sup>-1</sup> encontrado inicialmente no efluente, o que indicou vantagem ao utilizar a espécie fúngica.

Duwe (2013) utilizou as espécies *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 e *Pleurotus ostreatus* POS 560 para avaliar a micodegradação de efluente Kraft, o qual possui características recalcitrantes, pela presença do fenol. O autor avaliou a influência de pH, glicose e concentração do efluente *in natura*, e concluiu que a espécie que melhor conseguiu remover fenol (14%) do meio aquoso foi *Pleurotus ostreatus* POS 560, com 20% de efluente, 10 g L<sup>-1</sup> de glicose e pH 7,0.

Na China, Wen *et al.* (2011) utilizaram a espécie *Pseudotrametes gibbosa* para biodegradar em solo o pireno, hidrocarboneto policíclico aromático – (PAHs), de recalcitrância reconhecida, avaliando a influência da adição de seis diferentes tipos de cossustrato para melhoria da eficiência da remoção do poluente. Os autores verificaram que

a espécie fúngica foi capaz de consumir o pireno sem introdução de outra fonte de carbono, com remoção de 28%, e com a adição dos cossustratos houve melhoria na remoção do pireno. As melhores remoções foram atingidas com a introdução de farelo de trigo no solo, com 50,6% de remoção de pireno.

Sari, Tachibana e Itoh (2012) estudaram a capacidade da espécie *Trametes versicolor* U97 de degradar o DDT e conseguiram obter 73% de remoção do pesticida em matriz aquosa, utilizando 1mM de DDT.

Em termos de atrazina, a remoção via fungos ocorre com a substituição sequencial do anel aromático, o que inicia a dealquilação, sendo esse o principal passo da via metabólica de degradação do composto (PEREIRA, 2011).

Segundo Sene *et al.* (2010), as espécies *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavipes*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium luteum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trichoderma viride* conseguem metabolizar a atrazina, sendo os principais produtos de degradação a desetilatraxina e desisopropilatraxina, cabe mencionar que os subprodutos são menos tóxicos que a ATZ.

Pereira (2011) usou as espécies *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e *Pleurotus ostreatus* UFLA para avaliar a capacidade dos fungos de remover o herbicida atrazina, na concentração final de 10 mg L<sup>-1</sup>, de meio aquoso. A autora observou que a espécie que melhor conseguiu remover atrazina do efluente sintético foi *Pleurotus ostreatus* UFLA, com 65% de remoção do agrotóxico.

Já para organofosforados, os principais mecanismos envolvidos na utilização do composto pelos fungos é o da degradação, especialmente com fungos filamentosos, pois conseguem degradar a molécula do pesticida e utilizá-la como fonte de carbono e nutrientes (RAMADEVI *et al.*, 2012).

Rodrigues (2013) avaliou a remoção de metil paration por fungos de origem marinha (*Penicillium citrinum* e *Fusarium proliferatum*) e observou que após 20 dias o pesticida foi completamente degradado, o que indicou a aplicabilidade e utilização das espécies observadas durante o estudo. Silva (2013) utilizou também fungos de origem marinha para verificar a degradação de organofosforados, a saber, clorpirifós, metil paration e profenós. Os gêneros utilizados foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*, em meio líquido suplementado com malte a 2% e 50 mg L<sup>-1</sup> dos pesticidas (separados), com

monitoramento com 10 dias, 20 dias e 30 dias. O clorpirifós, ao final dos 30 dias, teve máxima remoção de 63% com a espécie *A. sydowii* CBMAIA 935 e de 72% com a espécie *Trichoderma sp.* CBMAIA 932. Para o metil paration, as melhores espécies foram, *A. sydowii* CBMAIA 935 e *P. decaturense* ambas com 100% de remoção em 20 dias. Já para o profenós, *A. sydowii* CBMAIA 935 foi capaz de degradar 70% e *P. raistrickii* removeu 100%, em 30 dias.

O potencial de micodegradação vem sendo estudado amplamente, com os mais variados compostos, inclusive com substâncias consideradas recalcitrantes. Destarte, a pesquisa com atrazina e metil paration em meio aquoso utilizando *Aspergillus niger* AN 400 corrobora com a necessidade de alternativas para o tratamento desses compostos persistentes.

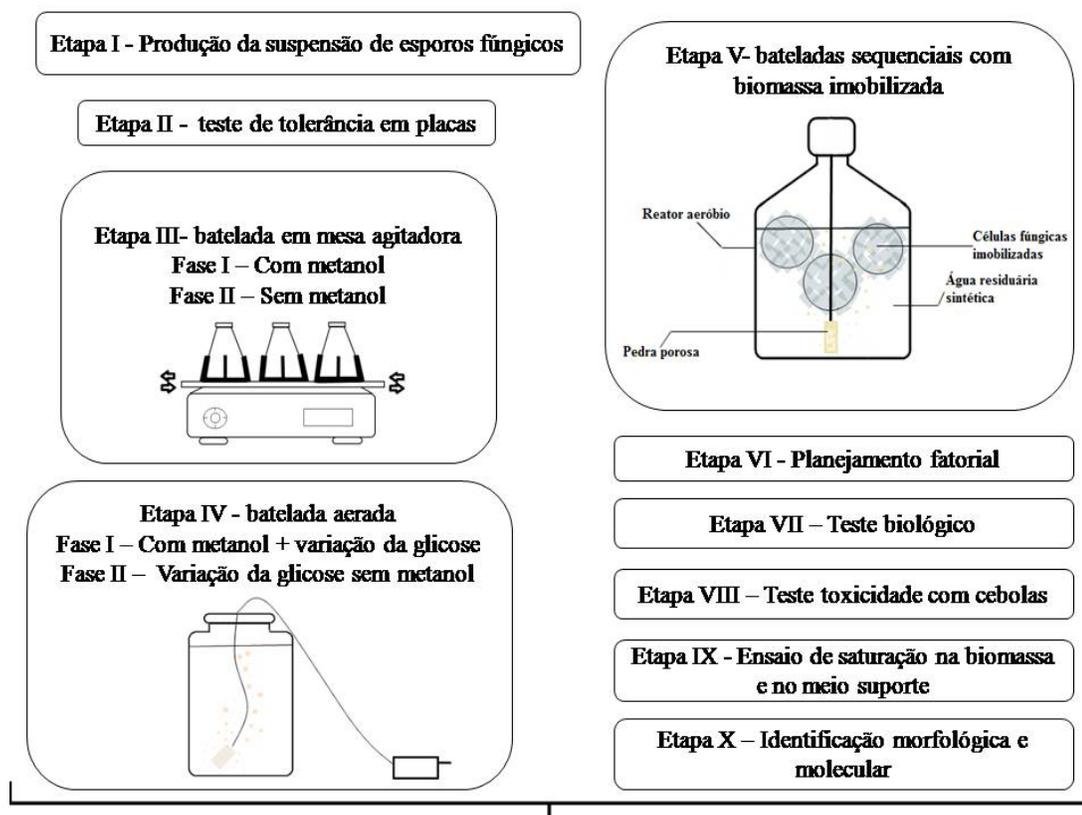
### 3 MATERIAIS E METÓDOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Ambiental – LATAM do Instituto Federal do Ceará – IFCE, campus Fortaleza/BR, e as análises dos pesticidas (atrazina e metil paration) foram realizadas no Laboratório de Análises Traço – LAT, da Universidade Federal do Ceará – UFC. A identificação morfológica e molecular da espécie fúngica foi realizada na Micoteca da Universidade do Minho – MUM, em Braga - Portugal. O trabalho compreendeu estudo sobre a degradação dos pesticidas atrazina (formulado comercial Gesaprim, com 500 g/L do ingrediente ativo atrazina) e metil paration (formulado comercial Folisuper 600 BR, com 600 g/L do ingrediente ativo metil paration) pela linhagem *Aspergillus niger* AN 400, trazida da Holanda.

O estudo foi constituído de dez etapas; produção de suspensão de esporos fúngicos (I), teste de tolerância em placas (II), batelada com biomassa dispersa em mesa agitadora com rotações de 150 rpm e 80 rpm (III), batelada aerada com biomassa dispersa (IV), reator em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada (V), planejamento fatorial na modalidade com biomassa imobilizada, para melhoria do processo (VI), Teste biológico (VII), Teste de toxicidade com cebolas (VIII) ensaio de saturação na biomassa e no meio suporte (IX) e identificação e caracterização morfológica e molecular da espécie fúngica presente nos reatores (X). A Etapa III foi subdividida em duas fases: Fase I – na qual foi verificada a influência da presença e ausência de metanol sobre a biodegradação dos pesticidas –, e Fase II, quando foi avaliada a influência da agitação do meio, na presença e ausência de metanol. A Etapa IV também foi subdividida, comparando-se a influência da adição de dois diferentes cossustratos, metanol e glicose (Fase I), avaliando-se a ação conjunta dos mesmos, e apenas na presença de glicose (Fase II), sobre o processo de micorremediação. Na Figura 6 está apresentado o esquema do desenvolvimento da pesquisa.

As concentrações de glicose basearam-se em trabalhos desenvolvidos por Rodrigues *et al.* (2010), Lopes *et al.* (2011) e Souza Neto (2012). Já a concentração do metanol foi adotada de acordo com a solubilização dos pesticidas na solução estoque preparada com os agrotóxicos comerciais, desta forma, foi inicialmente utilizada com intuito de melhorar a solubilidade dos pesticidas.

Figura 6 – Esquema de desenvolvimento da pesquisa.



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

### 3.1 Etapa I - Produção da suspensão de esporos fúngicos

A produção e contagem dos esporos da espécie *Aspergillus niger* AN 400 foi realizada de acordo com Sampaio (2005). Para cultivo do fungo, utilizou-se cepa de *Aspergillus niger* AN 400, cedida pelo LATAM. Para a preparação da suspensão de esporos, inoculou-se a cepa em placas de Petri, contendo meio de cultura Agar *Sabouraud*® Dextrose – previamente esterilizado em autoclave vertical por 20 minutos, a 120°C e 1 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão. As placas de Petri eram de vidro e também estéreis, foi utilizado 10 mL de meio em cada placa. Após a inoculação dos esporos, as placas foram levadas para estufa microbiológica Biopar®, durante o período de sete dias a ± 28°C.

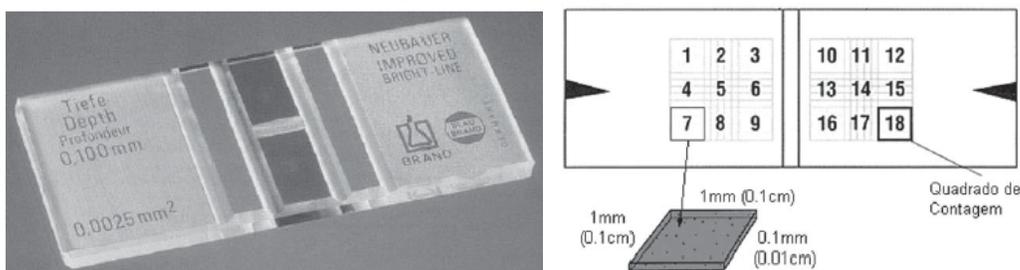
Ao final deste período de incubação, os esporos foram removidos das placas de Petri com adição de 5 µL de solução de Tween 80 (C<sub>64</sub>H<sub>124</sub>O<sub>26</sub>), surfactante não-iônico, para ajudar nos desprendimento dos esporos do meio de cultura, através de pipeta automática,

previamente esterilizada, formando uma suspensão que foi posteriormente transferida para frasco esterilizado de 100 mL, onde ficou armazenada sob refrigeração de  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ .

Os esporos foram contados a partir da suspensão preparada, utilizando-se 50  $\mu\text{L}$  da mesma, previamente agitada em Vórtex modelo Q1-901 por 30 segundos, e depois acrescida de 950  $\mu\text{L}$  de solução de Tween 80, resultando em uma solução de 1:20. Em seguida, 20  $\mu\text{L}$  da suspensão preparada foram transferidos para câmara de Neubauer (Figura 7) com profundidade de 0,1 mm e área mínima de  $1/400 \text{ mm}^2$ , onde foi realizada a contagem dos esporos em um microscópio óptico Bioval® com aumento de 400 vezes. Em cada quadrante da câmara realiza-se a contagem dos esporos, em total de 18 quadrantes, e depois utilizou-se a Equação 1 para realizar o cálculo do número de esporos na solução:

$$\text{Esporos/mL} = \text{esporos contados} \times \text{diluição} \times 2,5 \times 10^5 \quad \text{Equação 1.}$$

Figura 7 – Câmara de Neubauer.



Fonte: Lucarini; Da Silva; Bianchi (2004).

### 3.2 Etapa II - Teste de tolerância em placas

Foram utilizadas 28 placas de Petri, esterilizadas em autoclave vertical por 20 minutos a temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$  e  $1 \text{ kgf/cm}^2$  de pressão. Posteriormente, foram preenchidas com 10 mL de meio de cultura Agar *Sabouraud*® Dextrose e solução de esporos, inoculados por placa na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , conforme estudo de Rodrigues *et al.* (2010). As placas foram divididas em seis lotes, as quais foram feitas em duplicata, com exceção do controle, que foi feito em quadruplicata. As placas do primeiro lote não receberam adição de pesticidas, constituindo-se no controle (4 placas).

Nos lotes restantes foram adicionadas diferentes concentrações de metil paration, a saber:  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $30 \text{ mg L}^{-1}$  e  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e de atrazina foram  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $40 \text{ mg L}^{-1}$  (SAMPAIO, 2005). Foram 12 placas para as

concentrações de atrazina e 12 para metil paration. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ , durante sete dias, e diariamente observadas a fim de acompanhar o crescimento visual dos fungos.

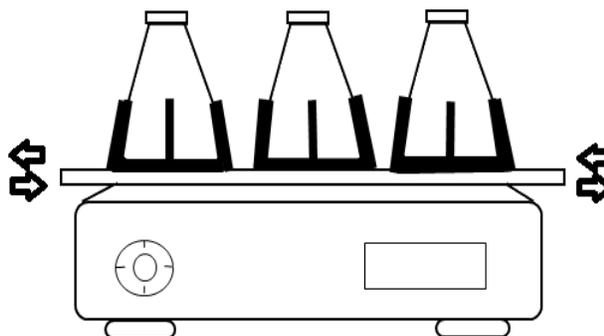
### 3.3 Etapa III - Batelada em mesa agitadora

Nesta etapa o metanol foi empregado como cossustrato, verificando-se a influência de sua presença e ausência na biodegradação de atrazina e metil paration em meio aquoso (Fase I). Na Fase II, utilizou-se a mesma composição de reatores da Fase I, aplicando-se agora as rotações de 80 rpm e de 150 rpm.

De um total de 224 reatores utilizados nas duas fases, cada uma delas possuía 28 reatores (frascos Erlenmeyers) esterilizados, cada um com volume total de 250 mL, e volume útil de 150 mL. Os reatores foram divididos em dois grupos: 14 reatores de controle (RC) contendo apenas a água residuária sintética e 14 reatores (RF) contendo a água residuária e suspensão fúngica. Os reatores foram mantidos em uma mesa agitadora com velocidade de 80 rpm e 150 rpm e a temperatura foi de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ , conforme esquema apresentado na Figura 8.

O tempo de reação foi de 192 h, baseado no crescimento fúngico, e os reatores foram desmontados depois de nove dias, sendo estudados os tempos de reação de 24, 48, 72, 96, 168, 192 e 216 h. A solução usada para alimentação dos reatores foi água destilada (autoclavada) acrescida de  $1 \text{ mL L}^{-1}$  de solução Vishniac, de esporos na concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/mL,  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de pesticida, definida com base no teste de crescimento fúngico em placas e nos trabalhos desenvolvidos no LATAM.

Figura 8 – Esquema da mesa agitadora utilizada na Etapa III.



Fonte: Autora, 2016.

A solução Vishniac (Rodrigues, 2010) possuía em sua composição:  $10 \text{ g L}^{-1}$  EDTA,  $4 \text{ g L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,22 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,47 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

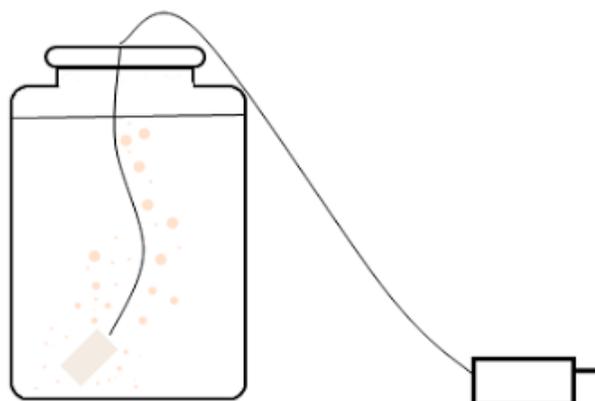
Para uso dos pesticidas, foram inicialmente preparadas duas soluções estoque, com  $1500 \text{ mg L}^{-1}$  de cada composto. Estas soluções, para os reatores que receberam adição de cossustrato, foram então diluídas em água destilada e metanol. Desta forma, nas soluções usadas, já havia presença do cossustrato metanol, sendo a concentração final deste nos reatores de 0,8% v/v. Nos reatores que não receberam metanol, a solução foi preparada sem adição do mesmo, apenas contendo a água destilada e os pesticidas para efeito de comparação.

### 3.4 Etapa IV - Batelada aerada com biomassa dispersa

Foram utilizados reatores de vidro, com volume útil de 3 L (Figura 9), e fornecimento de ar por minicompressores com vazão de 20 L/h. A concentração de esporos utilizada foi  $2 \times 10^6$  esporos/mL e as de atrazina, nos reatores com atrazina, e de metil paration, nos reatores com metil paration, foi de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ .

Nas bateladas aeradas utilizaram-se as mesmas soluções dos pesticidas obtidas nas bateladas em mesa agitadora, a primeira solução com metanol e a segunda apenas com água destilada. Foi acrescentada nessa etapa a glicose no meio.

Figura 9 – Modelo do reator utilizado na batelada aerada com biomassa dispersa.



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Nesta etapa, a batelada compreendeu 112 reatores, divididos em reatores contendo 0,8% v/v de metanol e glicose (Fase I) e de glicose (Fase II) nos reatores. A glicose teve sua concentração no meio variando de 0,5 a 5 g L<sup>-1</sup>, conforme já estudado por Araújo (2010), Xie *et al.*(2013), Souza Neto (2012) e Sampaio (2005). Na Tabela 4 está apresentada a nomenclatura dos reatores usados na pesquisa.

O tempo de reação foi de 216 h, e os reatores foram desmontados depois de nove dias. A água residuária sintética usada para alimentação dos reatores foi água destilada (autoclavada) acrescida de 1 mL L<sup>-1</sup> de Vishniac (10 g L<sup>-1</sup> EDTA, 4 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O, 1 g L<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub>O, 0,32 g L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O, 0,22 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> . 4H<sub>2</sub>O, 1,47 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O e 1 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O), além da variação de metanol e glicose apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Constituição de reatores usados nas bateladas aeradas e presença de glicose e metanol.

|                     | <b>Reator com ATZ</b> | <b>Metanol</b> | <b>Glicose</b> |                     | <b>Reator com ATZ</b> | <b>Metanol</b> | <b>Glicose</b> |
|---------------------|-----------------------|----------------|----------------|---------------------|-----------------------|----------------|----------------|
|                     |                       | RFMA           | X              |                     | -                     |                | RFA            |
|                     | RFMGA 0,5             | X              | X              |                     | RFGA 0,5              | -              | X              |
|                     | RFMGA 1               | X              | X              |                     | RFGA 1                | -              | X              |
|                     | RFMGA 2               | X              | X              |                     | RFGA 2                | -              | X              |
|                     | RFMGA 3               | X              | X              |                     | RFGA 3                | -              | X              |
|                     | RFMGA 4               | X              | X              |                     | RFGA 4                | -              | X              |
|                     | RFMGA 5               | X              | X              |                     | RFGA 5                | -              | X              |
| ETAPA III<br>Fase 1 | <b>Reator com MP</b>  | <b>Metanol</b> | <b>Glicose</b> | ETAPA III<br>Fase 2 | <b>Reator com MP</b>  | <b>Metanol</b> | <b>Glicose</b> |
|                     | RFMP                  | X              | -              |                     | RFP                   | -              | -              |
|                     | RFMGP 0,5             | X              | X              |                     | RFGP 0,5              | -              | X              |
|                     | RFMGP 1               | X              | X              |                     | RFGP 1                | -              | X              |
|                     | RFMGP 2               | X              | X              |                     | RFGP 2                | -              | X              |
|                     | RFMGP 3               | X              | X              |                     | RFGP 3                | -              | X              |
|                     | RFMGP 4               | X              | X              |                     | RFGP 4                | -              | X              |
|                     | RFMGP 5               | X              | X              |                     | RFGP 5                | -              | X              |

Legenda: RFMA- Reator com ATZ, fungo e metanol; RFMGA 0,5- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 1- Reator com ATZ fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 2- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 3- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 4 - Reator com ATZ, fungo, metanol e

glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 5 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>; RFA – Reator com ATZ, fungo; RFGA 0,5 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFGA 1 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFGA 2 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFGA 3 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFGA 4 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFGA 5 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>.

\*RFMP- Reator com MP, fungo e metanol; RFMGP 0,5- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 1- Reator com MP fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 2 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 3- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 4 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 5 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup> RFP – Reator com MP, fungo; RFGP 0,5 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFGP 1 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFGP 2 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFGP 3 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFGP 4 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFGP 5 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Autora, 2016.

### 3.5 Etapa V - Reator em Bateladas Sequenciais (RBS) com biomassa imobilizada

Para imobilização da espécie fúngica, utilizou-se 15 g de espuma de poliuretano como meio suporte, que foram cortadas em cubos de 1 cm de aresta e, posteriormente, lavadas com água de abastecimento e sabão. Em seguida, os cubos de poliuretano foram mantidos em estufa a  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  por 3 h para sua secagem.

Depois os cubos da espuma foram alocados em sacos de polietileno e esterilizados (em autoclave vertical por 20 minutos) e posteriormente foram colocados junto ao meio basal nutriente, previamente esterilizado, proposto por Rodrigues (2006)<sup>8</sup> para crescimento da biomassa nos reatores. Foi adicionado ainda 1 mL L<sup>-1</sup> de solução de Vishniac e 0,1 g L<sup>-1</sup> de antibiótico Megacilin Super Plus®, este último com intuito de minimizar a presença de bactérias no reator.

Depois de esterilizado o meio basal e as espumas, o conjunto ficou em repouso até que sua temperatura atingisse  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  e, só então, os esporos cultivados anteriormente foram inoculados no reator, de modo a obter a concentração de  $2 \times 10^6$  esporos/mL. Depois de colocados os esporos foi introduzida a aeração no reator por meio de mini compressores de ar, permanecendo assim por cinco dias, quando foi introduzido um novo meio de crescimento, estéril, com a mesma constituição do daquele colocado inicialmente, mantendo-se esta condição por mais cinco dias. A troca do meio basal ocorreu até que se pudesse verificar (visualmente) a presença da biomassa no reator, o que compreendeu a um período de 11 dias.

<sup>8</sup> O meio basal foi constituído de (mg L<sup>-1</sup>): glicose (5000); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1000); NaNO<sub>3</sub> (4000); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (800); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (40); CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (320); H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (200); MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (200); Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O (200); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (160) (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Os reatores eram recipientes de vidro (frascos de Duran), com capacidade de 5 L e volume útil de 4,5 L, como apresentado na Figura 10.



Legenda: A – Modelo do reator utilizado nas bateladas aeradas; B – processos de imobilização do fungo. Fonte: Autora, 2016.

### 3.6 Etapa VI - Planejamento fatorial

Foram realizados de forma independentes dois planejamentos fatoriais para investigar a influência da concentração de glicose e de pesticidas no meio. Foi utilizado o software (*STATGRAPHICS* Centurion, StatPoint technologies, Inc, VA 20186, USA), consistindo de 9 + 3 (pontos centrais), como apresentado na Tabela 5. Foi avaliada a interferência de duas variáveis independentes utilizando um delineamento fatorial fracionado, com 12 testes distintos – pormenorizados na Tabela 6. Cada teste foi realizado durante 7 dias, em reator com biomassa imobilizada – do mesmo modelo da Etapa IV, tanto para atrazina quanto para metil paration. As variáveis dependentes selecionadas para este estudo foi 0% de degradação de atrazina e de metil paration.

Tabela 5 – Faixa experimental e níveis dos fatores estudados no planejamento fatorial.

| Fatores          | Símbolo | Níveis                |                         |                       |
|------------------|---------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
|                  |         | -1                    | 0                       | +1                    |
| [ ] de glicose   | A       | 0,5 g L <sup>-1</sup> | 2,75 g L <sup>-1</sup>  | 5 g L <sup>-1</sup>   |
| [ ] de pesticida | B       | 5 mg L <sup>-1</sup>  | 17,5 mg L <sup>-1</sup> | 30 mg L <sup>-1</sup> |

Fonte: Autora, 2016.

Tabela 6 – Ensaios realizados no planejamento fatorial.

| Teste | Concentração de Glicose (g L <sup>-1</sup> ) | Concentração de ATZ (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentração de MP (mg L <sup>-1</sup> ) |
|-------|--|---|--|
| 1     | 2,75   | 5   | 5  |
| 2     | 0,5  | 5   | 5  |
| 3     | 2,75   | 17,5                                      | 17,5                                     |
| 4     | 2,75   | 17,5                                      | 17,5                                     |
| 5     | 2,75   | 30  | 30                                       |
| 6     | 2,75   | 17,5                                      | 17,5                                     |
| 7     | 5  | 30  | 30                                       |
| 8     | 5  | 17,5                                      | 17,5                                     |
| 9     | 0,5  | 17,5                                      | 17,5                                     |
| 10    | 5  | 5   | 5  |
| 11    | 0,5  | 30  | 30                                       |
| 12    | 2,75   | 17,5                                      | 17,5                                     |

Fonte: Autora, 2016.

### 3.7 Condições instrumentais

As análises realizadas nas etapas III, IV, V e VI foram pH, demanda química de oxigênio (DQO), conforme procedimentos descritos em APHA (2005) e os pesticidas, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu 20 A). Foi empregado um detector na região do ultravioleta e visível com arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, coluna CTO-20A do Laboratório de Análises de Traços (LAT), do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da UFC. A separação dos pesticidas foi realizada em coluna Supelco C18 (25 cm x 4,6 mm D.I; partículas de 5µm) nas seguintes condições cromatográficas: sistema de gradiente com fase móvel acetonitrila: água – 70%, tempo de corrida de seis minutos, detecção em comprimento de onda da atrazina em 220 nm e metil paration em 270 nm, com volume de injeção de 50 µL.

### 3.8 Etapa VII - Teste biológico

Com intuito de observar a prevalência da espécie fúngica, realizou-se contagem de Unidades Formadoras de Colônia – UFCs/mL nos reatores usados durante o planejamento experimental. O procedimento só foi realizado nesta etapa por dificuldades operacionais que inviabilizaram sua realização nas demais etapas.

O procedimento de contagem dos micro-organismos foi realizado através de diluição em série, utilizando-se meio específico, para contagem de bactérias, e meio Martin para contagem de fungos, conforme Andrade *et al.* (2013). Esses meios possuíam a seguinte composição:

- Meio nutriente-ágar da Dinâmica®: 15 g de bactoágar, 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 8 g de NaCl, 1000 mL de água destilada.
- Meio de Martin: 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  da Dinâmica®, 5 g de peptona da Acumedia®, 0,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  da Dinâmica®, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  da Dinâmica®, 10 g de dextrose da Merck®, 0,5 g de extrato de levedura da Acumedia®, 0,033 g de rosa bengala da Inlab®, 18 g de Agar da Acumedia®, 1000 mL de água destilada.

No tocante ao plaqueamento, inicialmente foram retirados dois cubos de polietileno (esponja contida no reator) e levados para erlenmeyers (volume total de 100 mL) contendo 60 mL de solução salina, com 0,9% de NaCl, e com pérolas de vidro tamanho 8. As pérolas foram colocadas para facilitar o desprendimento da biomassa da esponja.

Posteriormente levou-se o erlenmeyer para o agitador Vórtex até que visualmente a biomassa fosse desprendida da esponja. Feito o referido procedimento, retiraram-se alíquotas de 1 mL do erlenmeyer e transferiu-se para cubeta (previamente esterilizadas contendo 9 mL de solução salina), e assim sucessivamente até a obtenção das concentrações de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Depois que cada cubeta foi levada para o agitador Vórtex, com intuito de homogeneização da suspensão.

Ao final, 0,1 mL da suspensão contida nas cubetas foi adicionada aos meios de cultura para fungos e bactérias, os quais encontravam-se previamente autoclavados e solidificados, e depois com a alça de Drigalsky procedeu-se ao esfregaço na placa, as quais foram levadas à estufa microbiológica à temperatura de cerca de  $\pm 28^\circ\text{C}$ , e as contagens foram realizadas após 3 dias para bactérias e 5 dias para fungos.

A contagem foi realizada durante as 12 semanas em que durou o planejamento experimental, nos reatores com atrazina e nos reatores com metil paration.

### **3.9 Etapa VIII - Teste de toxicidade com efluente final**

Para realização do teste de toxicidade com o efluente final dos reatores operados em batelada sequencial com biomassa imobilizada, adaptou-se metodologia proposta por

México (2008). De acordo com o referido autor, bulbos de *Allium cepa* (cebola) são usados para investigação da toxicidade em resíduos líquidos (afluentes e efluentes).

Silva (2008) elencou vantagens para utilização de cebola em testes de toxicidade, como baixo custo, cultivo rápido e fácil, além de poder ser usado tanto para toxicidade aguda quanto para crônica.

O mecanismo de observação consiste na estimulação da cebola frente ao efluente contendo compostos considerados tóxicos. Quando o bulbo entra em contato com a água, ocorre o estímulo de suas raízes. No entanto, quando existem inibidores presentes na água que está em contato com a cebola, haverá retardo da divisão celular, e conseqüente diminuição ou paralisação do crescimento das raízes.

Para início do teste, selecionaram-se cebolas em um pré-teste, no qual 20 cebolas tiveram suas cascas e raízes cuidadosamente removidas. Posteriormente as cebolas foram colocadas em copos descartáveis contendo água de abastecimento e deixadas em local protegido da luz e livre de umidade. Passados três dias, as cebolas foram retiradas e foi observado o crescimento de suas raízes.

Foram utilizadas as cebolas que apresentaram crescimentos de raízes próximos para o teste com os efluentes dos reatores. As raízes desenvolvidas durante o pré-testes foram removidas e os bulbos foram reutilizados. Nos testes de inibição de raiz, a base dos bulbos foi colocada em copos plásticos contendo as amostras de caracterização (do reator com atrazina e do reator com metil paration), saída do reator com atrazina e do reator com metil paration, todas em triplicata. Após 72h as raízes foram medidas com uma régua. Foi empregado como controle negativo cebolas expostas apenas em água de abastecimento.

### **3.10 Etapa IX – Teste de saturação na biomassa e no meio suporte**

Para realização do teste de adsorção no biofilme, retirou-se um cubo de poliuretano de cada reator utilizado na etapa com bateladas sequenciais, no último ciclo de operação dos reatores, para que não houvesse prejuízo da concentração de micro-organismos presentes nos reatores.

O referido cubo, contendo a biomassa fúngica, foi colocado em um erlenmeyer contendo solução salina a 0,9% de NaCl e 20 pérolas de vidro (diâmetro de 3 mm), ambos previamente autoclavados por 15 minutos a 121°C. Posteriormente levou-se para agitação em 100 rpm em vórtex, com intuito da biomassa desprender da espuma e passar para o meio

líquido. Depois da agitação retirou-se o meio líquido e ele foi levado para centrifugação a 3500 rpm durante 10 minutos. Ao final do processo de centrifugação, separou-se o sobrenadante da biomassa, e à biomassa foram adicionados 10 mL de metanol para melhorar a remoção dos pesticidas da biomassa. O metanol com a biomassa foram centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos e depois adicionaram-se mais 5 mL de metanol ao tubo de centrifuga, que foi novamente centrifugado por 10 minutos. A leitura no cromatógrafo foi realizada com o sobrenadante.

### **Teste de saturação dos pesticidas na espuma de poliuretano**

A avaliação da saturação no meio suporte dos reatores com biomassa imobilizada ocorreu da seguinte forma: inicialmente utilizou-se um reator igual ao utilizado no decorrer dos experimentos, com capacidade de 5 L. A este reator adicionou-se a mesma quantidade de espumas de poliuretano usadas para imobilização da biomassa, 15 g. As espumas foram lavadas com água de abastecimento e sabão neutro, depois foram secas em estufas e por fim foram pesadas. Depois as espumas foram autoclavadas.

No reator foi colocada a mesma solução utilizada nos experimentos anteriores, com a mesma concentração de pesticida e de Visnhiac e as espumas estéreis. Montado o reator com as espumas, procedeu-se ao monitoramento da adsorção na espuma. A cada 10 minutos foi retirada alíquota da solução presente no reator e guardada para posterior determinação em cromatografia líquida e para DQO. Este procedimento foi feito para a ATZ e para o MP, separadamente. O tempo foi determinado com base no resultado das amostras de DQO, comparando-se a DQO da solução antes do contato com as espumas e com o passar do tempo.

### **3.11 Etapa X – Identificação, caracterização morfológica e molecular**

Com intuito de confirmar a presença da espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400, procedeu-se a identificação morfológica. Ao final do estudo, a espécie fúngica presente nos reatores usados no experimento foi repicada em meio Malte Extrato Ágar - MEA e em meio ágar extrato de levedura Czapeck - CYA. Após o crescimento das colônias, registrou-se em fotografias o crescimento da espécie. O crescimento foi analisado segundo aspectos morfológicos como textura, cor e aspecto do reverso da colônia.

Para identificação foi efetuada uma observação microscópica das estruturas morfológicas. Para visualização no microscópio, preparou-se a lâmina com retirada de esporos da periferia da placa (na qual a espécie crescera em meio MEA). Depois se adicionou uma gota de azul de algodão (previamente diluído com ácido láctico) e colocou-se a lamela em cima, para que então fosse levada para o microscópio.

As características microscópicas (cor das hifas, estruturas de reprodução sexuada e assexuada: conidióforo, conídios, presença de metula, localização das fiálides) foram comparadas com atlas de identificação (KLICH, 2002).

### **3.11.1 Extração do DNA**

Para a extração do DNA, retirou-se amostra para crescimento em meio líquido (MEA) durante sete dias. Posteriormente, retirou-se a biomassa e transferiu-se para placa de Petri estéril na qual a biomassa foi lavada com água destilada estéril para retirada do excesso de meio presente. O procedimento foi adaptado de Santiago (2011).

Para extração do DNA, seguiu-se aos seguintes procedimentos:

1. A biomassa (crescida por 7 dias em MEA) foi lavada com água estéril e depois colocada em ependorf (2 mL) e levados para centrifugação por 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. Depois lava-se com 1 mL de solução de NaCl com EDTA três vezes
2. Adicionaram-se 100 µL de solução de NaCl com EDTA (30 mM de NaCl, EDTA 2 mM, pH 8,0) e homogeneizou-se no vórtex.
3. Adicionaram-se 100 µL de lisozima (10 mg mL<sup>-1</sup>) diluída em solução de NaCl com EDTA.
4. Incubou-se em banho-maria por 1 h a 37°C.
5. Depois adicionaram-se 290 µL de NaCl.EDTA+ 50 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio diluído em água destilada, estéril) a 10 % + 10 µL de Proteinase K (20 mg L<sup>-1</sup>).
6. Depois incubou-se a 55° por 1 h.
7. Adicionaram-se 500 µL de fenol líquido PA.
8. Centrifugou-se a 12000 rpm a 22 ° C por 5 minutos.
9. Retiraram-se 350 µL do sobrenadante e colocou-se em outro ependorf. Acrescentou-se 2 vezes o volume que colocou de amostra de isopropanol (700 µL).
10. Centrifugou-se por 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C.

11. Descartou-se o sobrenadante.
12. Adicionaram-se 100  $\mu$ L de etanol 70% e agitou em vortex.
13. Centrifugou-se a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Depois descartou-se o etanol.
14. Adicionaram-se 50  $\mu$ L de água estéril.
15. Deixou-se na geladeira para o DNA ir para o meio líquido por um período máximo de 24 h, depois congelou-se.

Depois da extração procedeu-se a eletroforese. O procedimento consistiu em diluir 0,5 g de agarose em 50 mL de TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA)<sup>9</sup> 0,5 X. Depois ferveu-se em micro-ondas, até que ele ficasse transparente, aproximadamente 90 segundos. Quando ele ficou morno, acrescentaram-se 3  $\mu$ L do corante GreenSafe Premiun (Nzytech®), e colocou-se na cuba em que ocorreu a eletroforese.

### **3.11.2 Amplificação do DNA**

As reações de Reação em Cadeia da Polimerase - PCR foram realizadas utilizando o termociclador MJ Research, Inc.TTC-100. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 0,5 X, durante aproximadamente 1 hora a 120V. O resultado da PCR foi observado por eletroforese em gel de agarose 1%, e a visualização dos fragmentos de DNA foi feita sob luz ultravioleta.

O passo-a-passo para a reação em PCR foi:

- ✓ 25  $\mu$ L da MIX (MzYtag 2x Green-Master Mix)
- ✓ 1  $\mu$ L de cada primer (CL1 e CL2 genes da calmodulina)
- ✓ 2  $\mu$ L da amostra de DNA extraído
- ✓ 22  $\mu$ L de água destilada estéril.

Procedeu-se o mesmo com o branco, no qual a amostra foi substituída por água destilada.

O termociclador foi programado com a seguinte sequência: desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, um ciclo, seguido de desnaturação a 95°C por 50 segundos, 55°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto, 35 vezes de repetição, com extensão final de 72°C por 7 minutos.

---

<sup>9</sup> Para confecção da solução 0,5X, dilui-se a solução estoque, de 50 X , constituída de 242 g de Tris Base, 57,1 ml de ácido acético glacial, 37,2 g Na2EDTA.2H2O e Água MiliQ para 1 L.)

Posteriormente levou-se para o sequenciamento. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com sequências depositadas no GenBank Nucleotide Database usando o programa de pesquisa BLAST.

### **3.12 Análise estatísticas**

Com intuito de relacionar e analisar estatisticamente os dados obtidos, utilizaram-se representações gráficas do tipo *box plot*, onde é possível visualizar a distribuição dos dados, assim como sua assimetria e *outliers*. No referido tipo de gráfico são apresentados: primeiro quartil (Q1), terceiro quartil (Q3), ponto mínimo, mediana e ponto máximo do conjunto de dados analisados. O Q1 indica os 25% de dados que estiveram naquele intervalo de valores, enquanto que o Q3 refere-se aos 75%.

Posteriormente, os dados foram analisados, através do programa *GraphPad Prism* versão 5, por meio da análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey, onde os dados foram consideradas significativas a um nível de 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Etapa II – Teste de tolerância

Nesta etapa do estudo foram observados os diâmetros de crescimento da colônia fúngica em placas de Petri ao longo de 7 dias.

#### 4.1.1 Atrazina

A espécie *A.niger* AN 400, cresceu em todas as concentrações estudadas, percebendo-se o aumento do diâmetro das colônias com o aumento dos dias, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Crescimento do diâmetro, em centímetros, da colônia de *Aspergillus niger* em teste de tolerância com atrazina.

| Tempo de reação (horas) | Controle | 5 mg L <sup>-1</sup> | 10 mg L <sup>-1</sup> | 20 mg L <sup>-1</sup> | 30 mg L <sup>-1</sup> | 40 mg L <sup>-1</sup> |
|-------------------------|----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0                       | 0,0      | 0,0                  | 0,0                   | 0,0                   | 0,0                   | 0,0                   |
| 24                      | 0,9      | 1,2                  | 1,1                   | 0,8                   | 0,7                   | 0,7                   |
| 48                      | 2,1      | 2,1                  | 2,1                   | 1,9                   | 1,6                   | 1,6                   |
| 72                      | 3,9      | 3,8                  | 3,3                   | 3,0                   | 2,8                   | 2,7                   |
| 96                      | 4,8      | 4,3                  | 4,2                   | 4,0                   | 3,7                   | 3,7                   |
| 168                     | 7,7      | 7,5                  | 7,3                   | 7,1                   | 6,9                   | 6,0                   |
| 192                     | 8,3      | 8,3                  | 8,1                   | 7,4                   | 7,4                   | 6,8                   |

Fonte: Elaboração da autora, 2016.

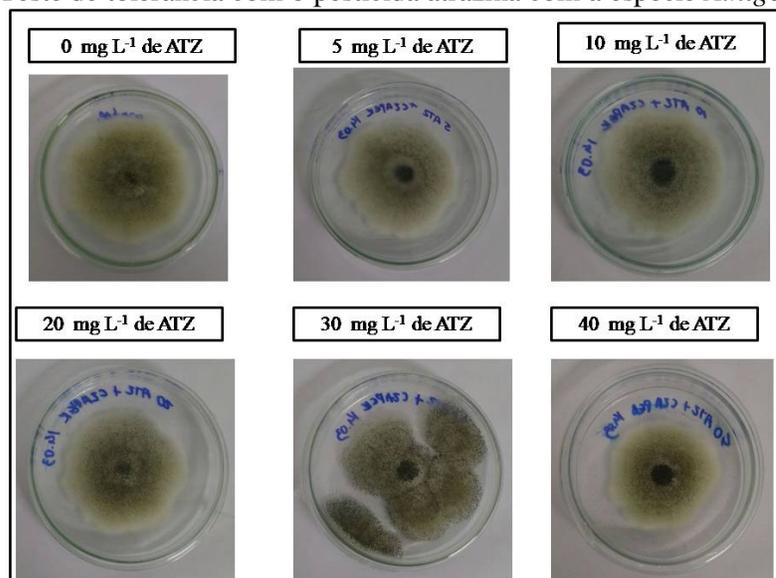
A espécie fúngica cresceu em todas as concentrações usadas, no entanto, observou-se que nas placas em que havia maior quantidade de atrazina, as colônias cresceram de forma mais lenta, o que pode indicar a maior dificuldade de degradação de atrazina diante do micro-organismo.

Os crescimentos obtidos nas placas controles, com 5 e 10 mg L<sup>-1</sup> de atrazina foram muito próximos do início ao final do teste. As placas com 5 mg L<sup>-1</sup> tiveram, inclusive, crescimentos superiores aos controles, com 24 h, indicando que a presença do herbicida não foi tóxica para o desenvolvimento fúngico nas placas com 5 mg L<sup>-1</sup> de ATZ . Contudo, a maior quantidade de ATZ parece ter influenciado no crescimento celular, pois nas concentrações superiores a 10 mg L<sup>-1</sup> observaram-se diâmetros reduzidos quando comparados aos controles, principalmente a concentração de 40 mg L<sup>-1</sup>.

Em estudo realizado por Kist (2013), a autora avaliou o crescimento das espécies *Pleurotus floridae* e *Pleurotus ostreatus* para degradação de compostos nitroaromáticos e observou que, em teste de crescimento em placas, que a elevação da concentração do poluente de 0,5% para 1% gerou a diminuição do crescimento radial fúngico, indicando assim a toxicidade do composto, como identificado no presente estudo.

Corroborando também com o presente estudo, Vancondio (2014) verificou a toxicidade do pesticida pentaclorofenol – PCP diante de espécies fúngicas de origem marinha, durante sete dias, e observou que dentre as concentrações testadas (10, 20, 30, 40 e 50 mg mL<sup>-1</sup>), houve diminuição do crescimento radial dos fungos, percebendo-se maior diminuição nas concentrações de 40 e 50 mg mL<sup>-1</sup>. A melhor espécie encontrada pela autora para utilização no tratamento do PCP foi o *Trichoderma harzianum*. Cabe mencionar aqui que as concentrações usadas por Vancondio (2014) foram superiores às testadas nesta pesquisa, o que indica que as espécies fúngicas se comportam de maneiras heterogêneas quando expostas a poluentes. A comparação é válida para perceber-se que existem concentrações mais propícias para o desenvolvimento microbiano em detrimento de outras. Na Figura 11 é possível visualizar que houve crescimento em todas as concentrações estudadas, com 7 dias.

Figura 11 - Teste de tolerância com o pesticida atrazina com a espécie *A.niger* com 7 dias.



Fonte: Autora, 2016.

#### 4.1.2 Metil paration

Diante da exposição do fungo ao metil paration, observou-se que o *A.niger* AN 400 foi capaz de se desenvolver em todas as concentrações estudadas, como pode ser visualizado através do acompanhamento do crescimento radial na Tabela 8.

Tabela 8 – Crescimento do diâmetro, em centímetros, da colônia de *Aspergillus niger* em teste de tolerância com metil paration.

| Tempo de reação (horas) | Controle | 5 mg L <sup>-1</sup> | 10 mg L <sup>-1</sup> | 20 mg L <sup>-1</sup> | 30 mg L <sup>-1</sup> | 50 mg L <sup>-1</sup> |
|-------------------------|----------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0                       | 0        | 0                    | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     |
| 24                      | 0,5      | 0,1                  | 0,1                   | 0,1                   | 0,1                   | 0,1                   |
| 48                      | 1,8      | 1,0                  | 1,1                   | 1,1                   | 0,8                   | 0,6                   |
| 72                      | 3,5      | 2,6                  | 2,3                   | 2,4                   | 1,9                   | 1,9                   |
| 96                      | 5,9      | 4,3                  | 3,7                   | 3,6                   | 3,4                   | 3,3                   |
| 168                     | 8,4      | 8,1                  | 8,3                   | 8,1                   | 7,9                   | 7,2                   |

Fonte: Autora, 2016.

A diferença verificada no crescimento do fungo foi relativa à maior concentração de MP nas placas. Foi possível perceber que na presença do MP houve menor crescimento, enquanto que nas placas controle a média dos diâmetros com 24 h foi de  $0,5 \pm 0,7$  cm; para as placas em que houve a adição do pesticida, a média não ultrapassou  $0,1 \pm 0,13$  cm. Com o passar do tempo os crescimentos ficaram mais próximos, indicando possível adaptação do micro-organismo ao pesticida. No entanto, em nenhuma concentração o crescimento na placa controle foi ultrapassado.

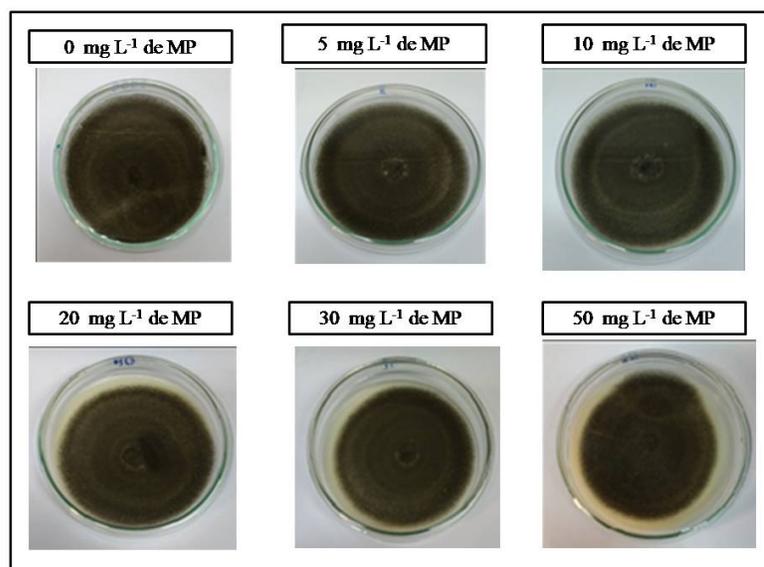
Com 48 h, a diferença entre a placa controle e as demais foi de 0,7 cm com as placas em que houve adição de 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>, de 0,8 cm com a placa com 5 mg L<sup>-1</sup>, de 1 cm e 1,2 cm, respectivamente para as placas com 30 e 50 mg L<sup>-1</sup>. Esse comportamento se reproduziu nos demais tempos reacionais, percebendo-se maior proximidade de crescimento apenas com 144 h, o que indica que a espécie fúngica precisou de mais tempo para se desenvolver quando esteve submetida à presença do MP.

Silva *et al.* (2013) também observaram que a presença de compostos recalcitrantes pode diminuir o crescimento em placas. Os autores estudaram a remoção do pesticida profenós por fungos marinhos, *Aspergillus sydowii*-CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* - 1241, *Penicilium. raistrickii* CBMAI 1235 e *Trichoderma sp.* CBMAI 932, e perceberam que nas concentrações de 80, 160 e 240 mg L<sup>-1</sup> do referido composto, houve diminuição visual do

crescimento fúngico nas placas. Os autores não realizaram a medição das colônias fúngicas, no entanto verificaram visualmente que ao longo de 10 dias nenhuma placa contendo o profenós obteve crescimento como nos controles, assim como no presente estudo.

É possível verificar na Figura 12 que ao final de 7 dias o *Aspergillus niger* AN 400 cresceu em todas as placas.

Figura 12 – Teste de tolerância com o pesticida metil paration com a espécie *A.niger* com 7 dias.



Fonte: Autora, 2016.

## 4.2 Etapa III - Batelada em mesa agitadora

A presente etapa foi realizada em mesa agitadora com rotação de 80 rpm e 150 rpm com os pesticidas atrazina e metil paration. Nos reatores controle dessa etapa não houve remoção dos pesticidas estudados.

### 4.2.1 Fase 1- Influência do metanol

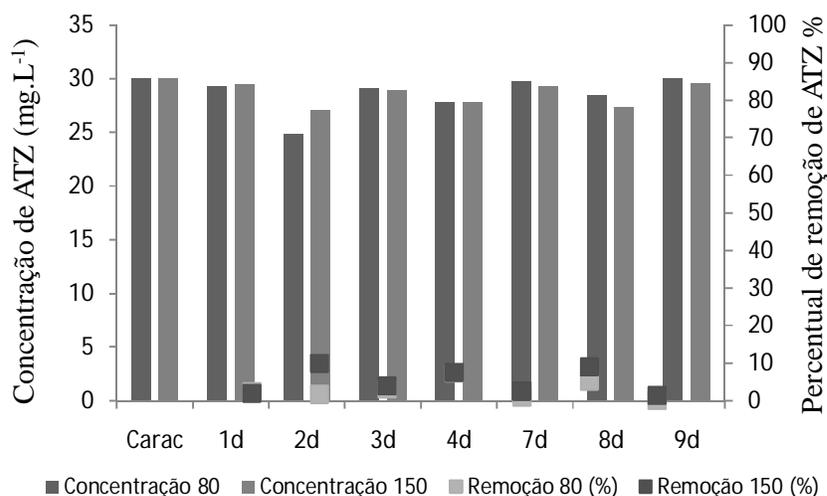
Nessa fase foi avaliada a presença de metanol nos reatores da etapa com variação rotacional.

#### 4.2.1.1 Atrazina

A verificação da possível influência do metanol ocorreu por sua presença na solução estoque dos pesticidas estudados. Depois de adicionados os pesticidas nas soluções, a concentração de metanol nos reatores foi de 0,8% v/v grau HPLC.

Para a ATZ, conforme Figura 13, o aumento rotacional de 80 rpm para 150 rpm culminou em discreta melhoria dos percentuais de remoção. Com 80 rpm, a máxima remoção ocorreu no quarto dia de reação, 7,5%. Com 150 rpm, o maior percentual observado foi de 9,5%, com 48 h de reação. Os valores mais baixos foram encontrados no último TR (9 dias), onde os reatores na batelada de 80 rpm não conseguiram remoção alguma, e os reatores com 150 rpm obtiveram 1% de remoção de ATZ.

Figura 13 – Influência da rotação na concentração de ATZ e sua remoção ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm com adição de metanol.



Fonte: Autora, 2016.

Em termos gerais, as remoções ficaram próximas, demonstrando que o aumento rotacional não influenciou nas remoções de ATZ encontradas.

Assim como a remoção de ATZ, a de DQO bruta foi baixa, o que, provavelmente, ocorreu pela presença do metanol no meio, o qual possui elevada DQO e pode assim ter provocado inibição da espécie fúngica por excesso de substrato (BARROSO, 2006). A caracterização da solução continha 7014 mg L<sup>-1</sup> em termos de DQO, e no último dia de reação o valor encontrado foi de 6680 mg L<sup>-1</sup>. A baixa remoção de matéria orgânica no meio pode

ter sido influenciada também pelo tempo de contato com o fungo, o qual pode não ter sido suficiente para metabolização do álcool.

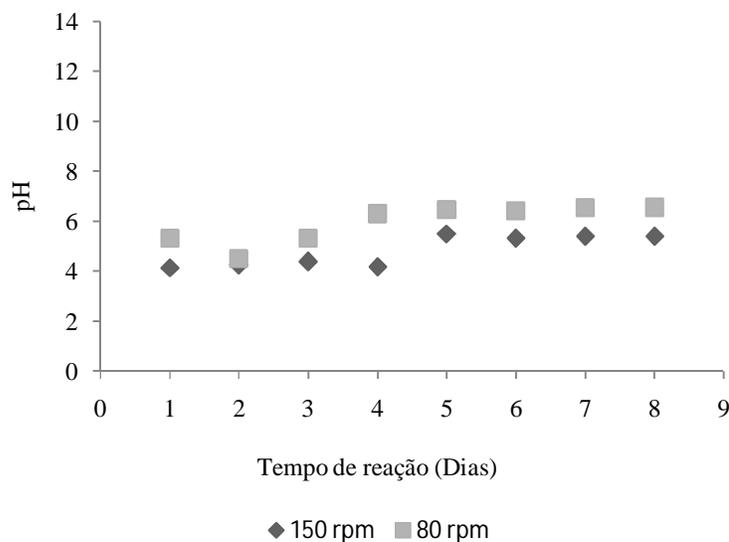
Barroso (2006), avaliando a influência da presença do metanol (de 0% a 6%) no crescimento fúngico em meio líquido contendo 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, observou que 3% de metanol (v/v) foi a condição em que houve maior crescimento da espécie *Aspergillus niger* F11, ao passo que em 5 e 6% houve baixo crescimento do micro-organismo. No presente estudo, em termos de v/v, foi utilizado 0,8% de metanol no meio, concentração esta, que de acordo com os estudos de Barroso (2006), não seria tóxica aos micro-organismos. No entanto, é salutar ressaltar, que a atrazina talvez necessite de uma fonte de carbono que seja mais facilmente assimilada, como sacarose ou glicose, para que os fungos possam degradá-la prontamente (USHARANI; MUTHUKUMAR, 2013).

A presença do metanol poderia ter auxiliado na degradação de atrazina, servindo como cosubstrato, assim como no trabalho de Mendonça (2009). O autor concluiu que a adição de metanol na concentração de 5% em reatores anaeróbios, usados para o tratamento de água de produção de petróleo, culminou no alcance de melhores percentuais de remoção de matéria orgânica (em termos de DQO), a saber, 50%. De acordo com o autor, a utilização do metanol como cossustrato favoreceu o crescimento da biomassa no reator UASB, e consequentemente possibilitou melhoria na remoção da matéria orgânica do efluente.

Souza (2011) também utilizou metanol como fonte suplementar de carbono em lodos ativados usados para tratamento de esgoto sanitário e obteve remoção de DBO de 100% em reator em batelada. No entanto, neste trabalho, a presença de metanol não possibilitou alcance de melhores resultados, possivelmente pelo excesso de matéria orgânica no meio, e pela presença de um composto recalcitrante.

Associado à não remoção de DQO e de ATZ, observou-se pouca variação de pH nos reatores ao longo da batelada, fato que pode estar associado à não utilização do substrato disponível para os fungos. De acordo com Lopes *et al.* (2011), elevadas concentrações de matéria orgânica podem limitar o crescimento fúngico no meio, além de inibi-lo por completo. Conforme Figura 14, o pH oscilou entre 5,3, valor encontrado na caracterização e 5,5 com nove dias de operação. A faixa de pH em que os reatores mantiveram-se está, de acordo com Tortora *et al.* (2012), apropriada para o desenvolvimento da espécie *Aspergillus niger*, o que pode corroborar com a tese de que, provavelmente o excesso de matéria orgânica disponível nos reatores pode ter causado o baixo alcance de remoção de atrazina.

Figura 14 – Variação do pH nos reatores contendo ATZ ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm com adição de metanol.



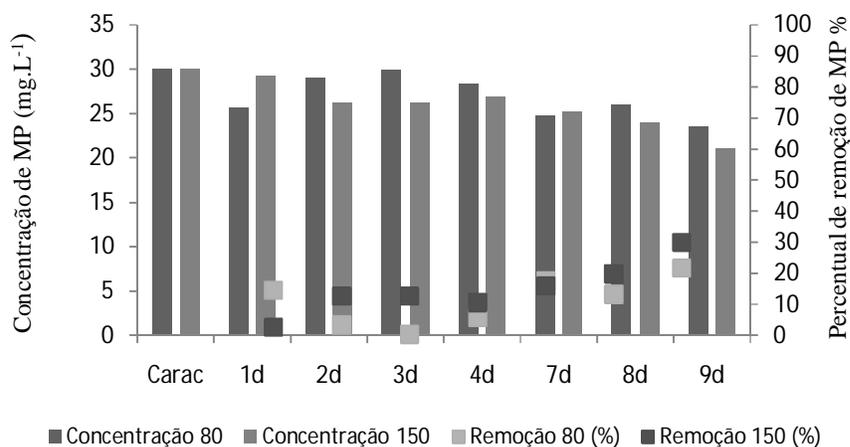
Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Dessa forma, a maior rotação influenciou, embora que de maneira discreta, a remoção de ATZ, pois a remoção nos reatores com 80 rpm foi de 7,5% com 96 h, e com 150 rpm, foi de 9,5%, com 48 h de reação.

#### 4.2.1.2 Metil paration

Em termos de metil paration, a maior remoção ocorreu com 150 rpm e nove dias de operação (30%). Nas bateladas com 80 rpm o maior percentual de remoção encontrado foi de 22%, no último dia do experimento, como apresentado na Figura 15. De fato, houve remoção de MP com maior facilidade pelos micro-organismos quando comparado com ATZ, no entanto, quando se observou a variação de DQO ao longo do experimento, percebeu-se que a mesma, assim como para os reatores contendo ATZ, não decaiu de forma acentuada, pois o afluente tinha concentração de  $8600 \text{ mg L}^{-1}$  e o efluente de  $7081 \text{ mg L}^{-1}$ .

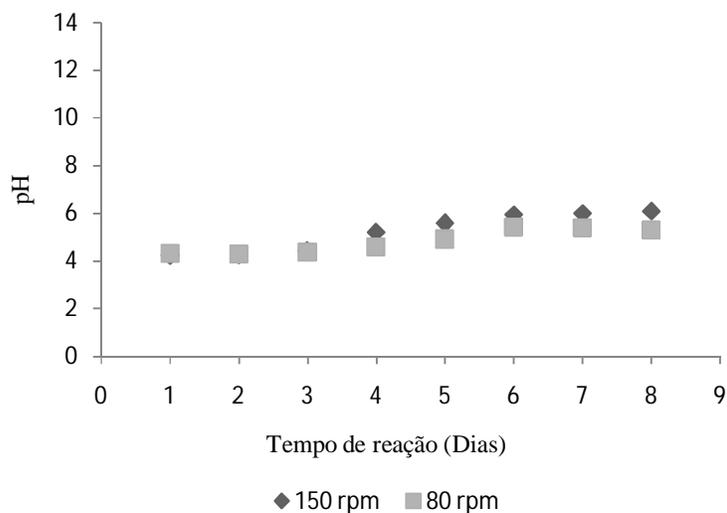
Figura 15 – Influência da rotação na concentração de MP e sua remoção ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm com adição de metanol.



Fonte: Autora, 2016.

O pH dos reatores com MP aumentou ao longo do tempo reacional. A Figura 16 apresenta a variação de pH das bateladas com metanol a 80 e 150 rpm. Os menores valores de pH foram na caracterização. Com 150 rpm, o maior valor foi de 6,1 no 9º dia de operação, enquanto que com 80 rpm o maior pH foi de 5,4 com TR de 8 dias.

Figura 16 - Variação do pH nos reatores contendo MP ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm com adição de metanol.



Fonte: Autora, 2016.

Assim como para atrazina, as melhores remoções de metil paration ocorreram com a maior rotação utilizada, pois com 80 rpm o máximo observado foi de 22% e com 150 rpm o máximo foi de 29,5%, ambos no TR de 9 dias.

Otoni (2012) obteve os melhores percentuais de remoção de 100% do corante Reativo Preto 5, na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. A espécie fúngica utilizada foi *T. versicolor* MUM 04.100, cultivada em reatores operados em batelada agitada com 150 rpm. Assim, sugere-se que a rotação de 150 rpm pode possibilitar, para espécies fúngicas, um bom desempenho de crescimento e remoção de poluentes.

#### **4.2.2 Fase 2 – Sem metanol**

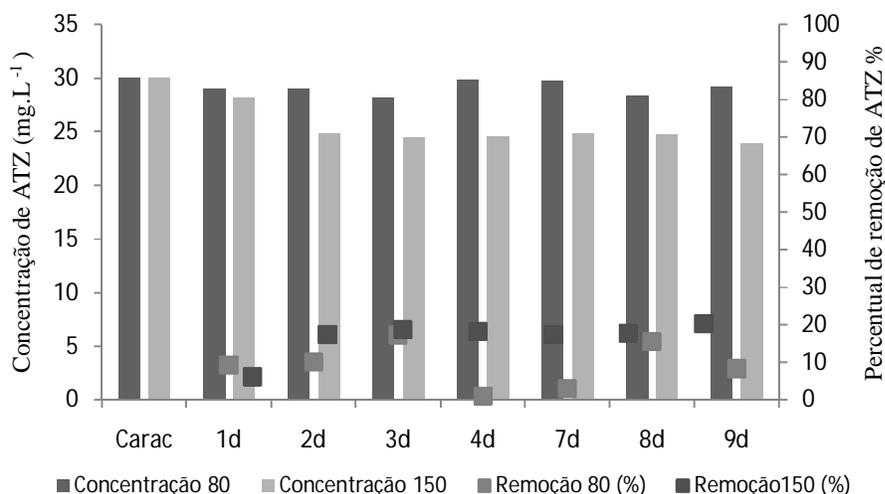
Nesta fase foi retirado o metanol da solução que alimentou os reatores com ATZ e MP, ficando apenas os pesticidas como fonte de carbono.

##### **4.2.2.1 Atrazina**

A retirada do metanol da solução que alimentou os reatores em bancada proporcionou melhores resultados de remoção do pesticida ATZ. Com 80 rpm, a máxima remoção de ATZ foi de 6%, com tempo de reação de três dias. Para os reatores com agitação rotacional de 150 rpm, a maior remoção foi de 20%, com tempo de reação de nove dias, conforme apresentado na Figura 17.

Houve, assim como nos reatores com metanol, melhoria do desempenho dos reatores com rotação de 150 rpm em detrimento daqueles com rotação de 80 rpm. Observou-se também que com a diminuição da concentração de matéria orgânica, na batelada com 150 rpm houve aumento dos percentuais de remoção de ATZ.

Figura 17 – Influência da rotação na concentração de ATZ e sua remoção ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm, sem metanol.



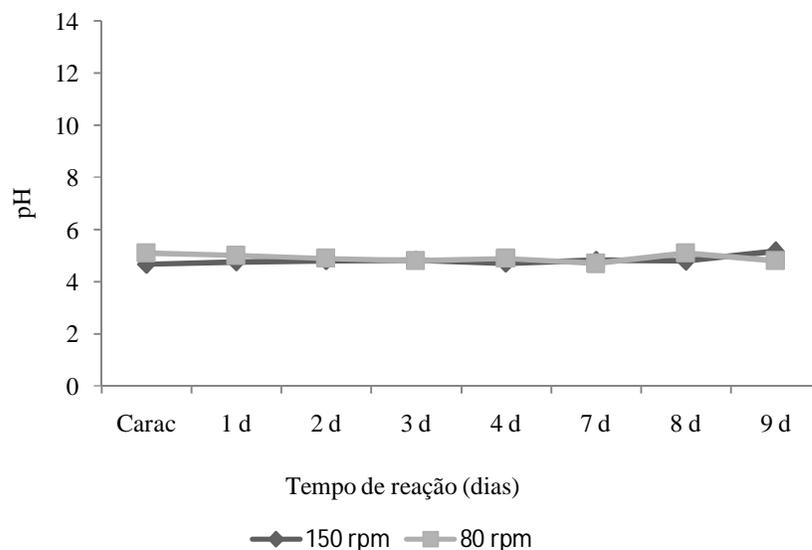
Fonte: Autora, 2016.

Outros autores também estudaram a utilização de fungos para remover atrazina do ambiente, Henn (2009), por exemplo, avaliou a capacidade de 12 espécies fúngicas em degradar os herbicidas diuron e atrazina e observou que a espécie que mais conseguiu degradar ATZ foi MCA 17 *Agaricales* (em meio contendo glicose a 1% como fonte de carbono e 0,01% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como fonte de nitrogênio e 25 mg L<sup>-1</sup> de ATZ) com remoção de 38,67% em 20 dias de cultivo.

Assim como estudo de Henn (2009), o presente trabalho, também conseguiu remover a atrazina da água residuária sintética, sendo 9,66 mg L<sup>-1</sup> nesta etapa da pesquisa, o que corrobora a hipótese de que os fungos podem ser utilizados em tratamento com compostos xenobióticos.

Em termos de pH, houve variações muito próximas entre as diferentes rotações avaliadas, como pode ser visualizado na Figura 18, mantendo-se sempre o meio ácido.

Figura 18 – Variação do pH nos reatores contendo ATZ ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm sem metanol.



Fonte: Elaboração própria, 2016.

Esse comportamento do pH pode estar associado à remoção de DQO, a qual chegou a 99% de remoção com sete dias de operação nos reatores com 150 rpm. Nos reatores com 80 rpm, a máxima remoção de matéria orgânica ocorreu com quatro dias de operação (86%). Para degradação da matéria orgânica no meio, os fungos liberam ácidos que influenciam na dinâmica de basicidade e acidez do sítio em que estão (TORTORA *et al.*, 2012). Como houve relevante remoção de DQO, e conseqüentemente liberação de ácidos orgânicos, o pH do meio permaneceu na faixa ácida.

Assim como para remoção de ATZ, os melhores percentuais de remoção de DQO encontrados foram nos reatores com 150 rpm, o que pode ser atribuído, provavelmente, a melhor transferência de massa ocorrida neles pela maior agitação (STUANI *et al.*, 2014).

Nessa mesma linha, Pizato (2013), avaliando a capacidade da espécie fúngica *Lasiodiplodia theobromae* MMPI na degradação de corante têxtil, concluiu que as melhores rotações para a remoção do corante foram entre 100 e 125 rpm, e que os piores resultados ficaram abaixo de 80 rpm, assim como nesta pesquisa

Em contraposição, Costa (2008) ao avaliar a capacidade de consórcio microbiano em remover cor e turbidez em efluente de lavanderia, com variações da rotação de zero, 50 e 100, observou que a melhor foi de 50 rpm, tanto para remoção de cor como de turbidez.

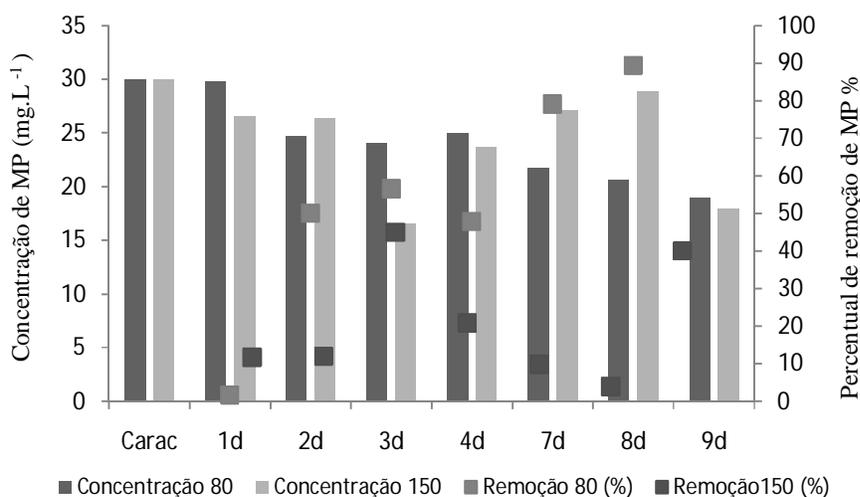
Nesse contexto, a variável independente rotação pode contribuir, assim como outros fatores que podem ser cruciais para o desenvolvimento dos micro-organismos envolvidos no tratamento, pois a fonte de carbono, disponibilidade de micronutrientes, toxicidade do poluente alvo e pH podem também influenciar a dinâmica de degradabilidade em sistemas biológicos. A influência da agitação pode depender também das características da espécie fúngica.

#### 4.2.2.2 Metil paration

Sobre a remoção de metil paration, observou-se que a rotação de 150 rpm também influenciou no alcance de melhores percentuais de remoção do poluente, com máxima de  $45\% \pm 9$  no terceiro dia de operação, enquanto que para os reatores com 80 rpm a máxima verificada foi de  $37\% \pm 7$ , no último tempo reacional (9 dias). Observou-se que a retirada de metanol do efluente sintético também proporcionou melhor desempenho de remoção de MP nas bateladas de 80 rpm e de 150 rpm.

A variação da concentração do MP e de sua respectiva remoção ao longo das bateladas com os reatores agitados em 80 e 150 rpm estão apresentada na Figura 19.

Figura 19 – Concentração de MP e sua remoção ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm, sem metanol.

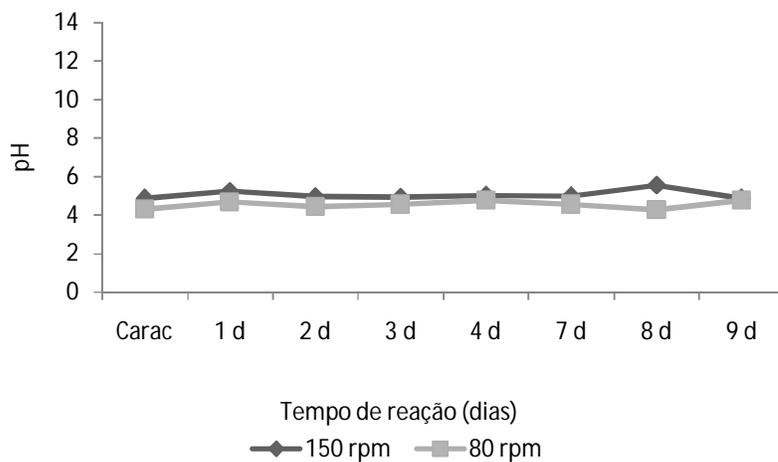


Fonte: Autora, 2016.

Ensaio com rotação semelhante ao desta pesquisa foi o realizado por Silva (2013), a qual a autora verificou a capacidade de espécies fúngicas degradarem clorpirifós, metil paration e profenós na concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  em meio líquido. A rotação usada foi de 130 rpm, e a autora observou que depois de 30 dias houve 72% de remoção de clorpirifós pela espécie *A. sydowii* CBMAIA 935 e de 100% de remoção de profenós pela *P. raistrickii*. A remoção total do metil paration foi observada com 20 dias de operação dos reatores, utilizando as espécies *A. sydowii* CBMAIA 935 e *P. decaturense*. A maior remoção obtida pela autora pode estar atrelada ao maior tempo de contato entre as espécies fúngicas e o efluente, pois no presente estudo obteve-se remoção de 45% de MP em apenas 9 dias de reação.

A remoção de DQO foi elevada, chegando a 95% com 4 dias de operação em 150 rpm e 53% com 9 dias e 80 rpm. Esse comportamento pode estar ligado ao da variável pH, visto que permaneceu em meio ácido durante todo o experimento, como apresentado na Figura 20. A acidificação da água sintética pode indicar a liberação de subprodutos advindos do consumo do inseticida, visto que na presença de metanol também houve remoção de MP e acidificação do meio. Um dos subprodutos do consumo do MP pode ser o 4-nitrofenol (também chamado de p-nitrofenol) que se apresenta como aceptor de elétrons forte, o que o deixa mais ácido em solução, podendo assim ser responsável pela diminuição do pH no meio (SILVA, 2013).

Figura 20 – Variação do pH nos reatores contendo MP ao longo da batelada em mesa agitadora com 80 e 150 rpm sem metanol.



Fonte: Autora, 2016.

O pH ácido pode ter contribuído para o alcance dos melhores percentuais de remoção de MP obtidos nessa fase do estudo, pois a faixa ácida sugere melhor condição para o desempenho de espécie fúngicas, em especial as filamentosas, pois proporciona ambiente favorável a maior liberação de enzimas no meio (TEBBOUCHE *et al.*, 2015).

As variações rotacionais e de adição de metanol indicaram diferentes condições para o desenvolvimento do fungo, assim como da sua capacidade de utilizar os pesticidas como fonte de energia. Na Tabela 9 está apresentado o comportamento do fungo diante das variações realizadas nas fases I e II, em resumo, com os percentuais de remoção durante as duas fases de operação das bateladas agitadas.

Diante das variações de condições, observou-se que para espécie *Aspergillus niger* AN 400, em batelada com variação rotacional de 80 e 150 rpm, e de metanol, observou-se que a condição (sem metanol) foi melhor, e a melhor rotação foi a 150 rpm, baseando-se nos maiores percentuais de remoção de ATZ e MP. O metanol utilizado como cossustrato parece não ser propício para tal finalidade, visto que sua presença na solução não culminou em melhores percentuais de remoção.

Tabela 9 – Percentuais de remoção durante as duas fases de operação das bateladas agitadas, para diferentes tempos de reação (TR).

| TR    | ATZ com metanol |        | ATZ sem metanol |        | MP com metanol |        | MP sem metanol |        |
|-------|-----------------|--------|-----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
|       | 150 rpm         | 80 rpm | 150 rpm         | 80 rpm | 150 rpm        | 80 rpm | 150 rpm        | 80 rpm |
| 24 h  | 2               | 2,5    | 6               | 3      | 2,5            | 14,5   | 12             | 1      |
| 48 h  | 10              | 2      | 17              | 4      | 12,5           | 3      | 12             | 17     |
| 72 h  | 3,5             | 3      | 19              | 6      | 13             | 0,3    | 45             | 20     |
| 96 h  | 4,5             | 7      | 18              | 0      | 10,5           | 6      | 21             | 17     |
| 168 h | 2,5             | 0,8    | 17              | 1      | 16             | 17,5   | 10             | 28     |
| 192 h | 9               | 5      | 18              | 5      | 20             | 13     | 4              | 31     |
| 216 h | 1               | 0      | 20              | 3      | 30             | 22     | 40             | 37     |

Fonte: Elaboração própria, 2016.

### **4.3 Etapa IV - Batelada aerada com biomassa dispersa**

Nesta etapa os reatores foram utilizados com volume útil de 3 L e a aeração foi promovida por minicompressores de ar. Nos reatores controle dessa etapa não houve remoção dos pesticidas estudados.

#### ***4.3.1 Fase 1 – Influência do metanol com variação da concentração de glicose***

A presença do metanol foi analisada juntamente com a variação de glicose no efluente sintético nesta fase. Cabe mencionar que o metanol foi mantido nesta fase para verificar se diante de poluente diferente poderia ocorrer comportamento fúngico diferente.

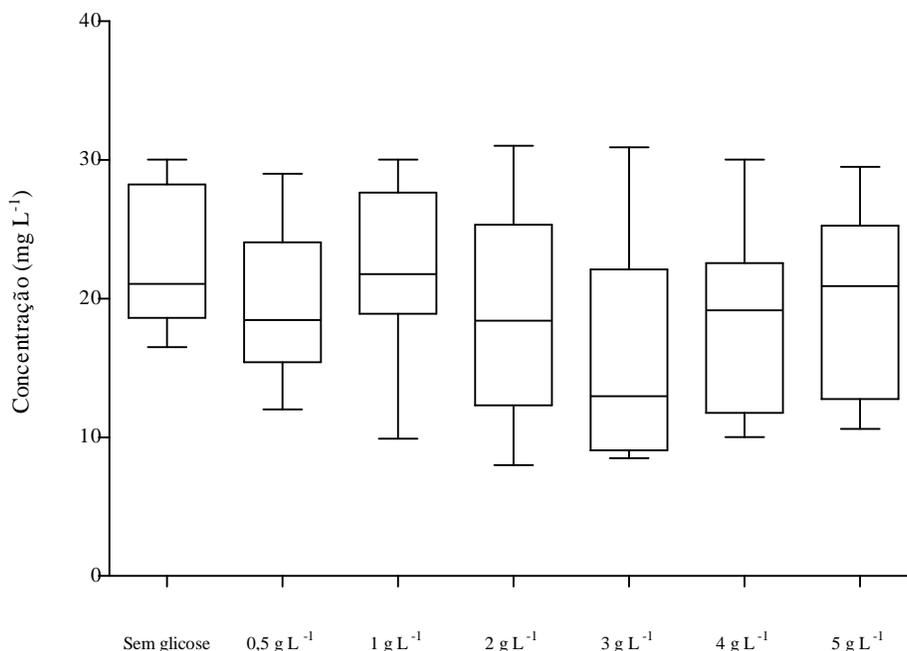
##### ***4.3.1.1 Atrazina***

A maior remoção de atrazina, nos reatores em batelada com biomassa dispersa, ocorreu no último tempo reacional, a saber: 45%, 60%, 67%, 73%, 72%, 67% e 64,5%, respectivamente, nos reatores RFMA, RFMGA 0,5, RFMGA 1, RFMGA 2, RFMGA 3, RFMGA 4 e RFMGA 5. Na Figura 21 está apresentada a variação da atrazina nos reatores estudados. Observou-se que as maiores remoções de ATZ ocorreram nos reatores RFMA 2 e RFMA 3, o que indicou a necessidade de substrato de assimilação mais fácil para que ocorra o consumo do herbicida.

Corroborando com o presente estudo, outros trabalhos também avaliaram a necessidade de adição de fonte de carbono de assimilação mais fácil em tratamentos biológicos com poluentes, e identificaram que os micro-organismos necessitam dessa fonte adicional para conseguir degradar a molécula de compostos persistentes, assim como a atrazina (FONTANA; SILVEIRA, 2012; XIE *et al.*, 2013).

Papagianni (2007) relatou que concentrações elevadas de fontes de carbono podem conduzir à repressão enzimática e conseqüentemente à redução da capacidade de micodegradação, o que irá variar de uma espécie para outra. Essa afirmação pode explicar porque nos reatores desta pesquisa, nos RFMGA 4 e nos RFMGA 5, não foram observadas maiores remoções quando comparados aos demais.

Figura 21 – Concentração da ATZ ao longo da batelada com biomassa dispersa, com adição de metanol e glicose em concentrações variadas.

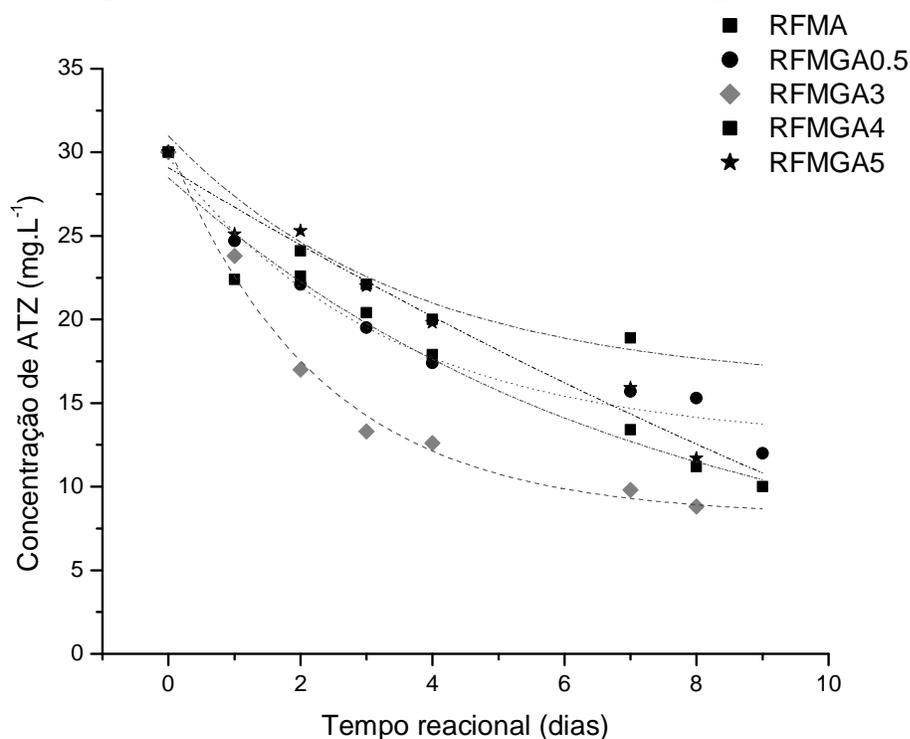


Fonte: Autora, 2016.

Através da remoção de ATZ avaliou-se a velocidade de seu consumo nos reatores. A reação seguiu uma cinética de primeira ordem (Figura 22) para os reatores RFMA, RFMA 0,5, RFMA 3, RFMA 4 e RFMA 5 e as constantes de velocidade foram calculadas em *software* OriginPro 6.1, aplicando-se a equação:  $1/C = 1/C_0 + K^* (t - t_0)$ , sendo C a concentração do pesticida no tempo;  $C_0$  é a concentração inicial do pesticida;  $k$  é a constante de velocidade de primeira ordem expressa em  $d^{-1}$ , e  $t$  é o tempo e  $t_0$  é o tempo inicial. Os demais reatores não se ajustaram em modelo de ordem zero ou primeira ordem.

Conforme apresentado na Tabela 10, verificou-se que a maior velocidade foi encontrada no reator com 72% de remoção de atrazina, o qual continha adição de  $3 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Em contrapartida, as velocidades mais baixas foram nos reatores RFMGA 4 e RFMGA 5, o que pode ter acontecido pelo excesso de substrato, que demorou mais tempo para ser utilizado pela espécie fúngica, visto que as remoções dos referidos reatores também foram expressivas.

Figura 22 – Decaimento da concentração da ATZ ao longo da batelada com biomassa dispersa, com adição de metanol seguindo cinética de primeira ordem.



Legenda: RFMA- Reator com ATZ, fungo e metanol; RFMGA 0,5- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 1- Reator com ATZ fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 3- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 4 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 5 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Autora, 2016.

Tabela 10 – Velocidade de consumo de ATZ nos reatores em batelada dispersa com presença de metanol e variação de glicose.

| Varição de glicose (g L <sup>-1</sup> ) | Velocidade (d <sup>-1</sup> ) | Valor do R <sup>2</sup> | Remoção de ATZ com 9 dias (%) |
|---|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 0                                       | 0,28                          | 0,94                    | 45                            |
| 0,5                                     | 0,27                          | 0,97                    | 60                            |
| 3                                       | 0,46                          | 0,99                    | 72                            |
| 4                                       | 0,15                          | 0,97                    | 67                            |
| 5                                       | 0,02                          | 0,97                    | 64,5                          |

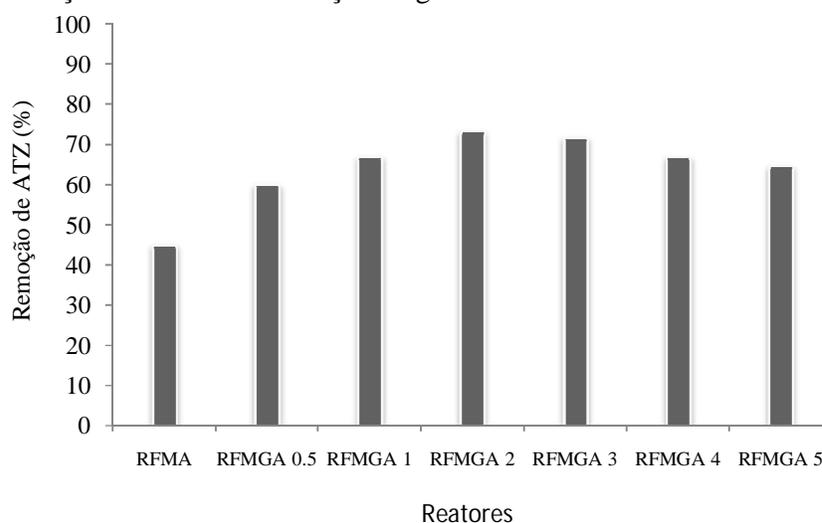
Fonte: Autora, 2016.

É importante ressaltar que em todos os reatores houve decaimento da concentração de atrazina, o que indica que os micro-organismos foram capazes de degradar o poluente, embora tenham precisado de fonte adicional de carbono para alcançar melhores

percentuais de remoção, como também foi relatado nos estudos de Xie *et al.* (2013) e Getenga *et al.* (2009).

A presença da glicose parece ter influenciado na remoção da ATZ do meio, pois nos reatores em que não houve presença de glicose foi encontrada a remoção mais baixa do herbicida, 45%, conforme apresenta a Figura 23. Pode-se observar que os melhores percentuais foram nos reatores RFMGA 2 e RFMGA 3.

Figura 23 – Remoção de ATZ com TR de 9 dias nas bateladas com biomassa dispersa, com adição de metanol e variação de glicose.

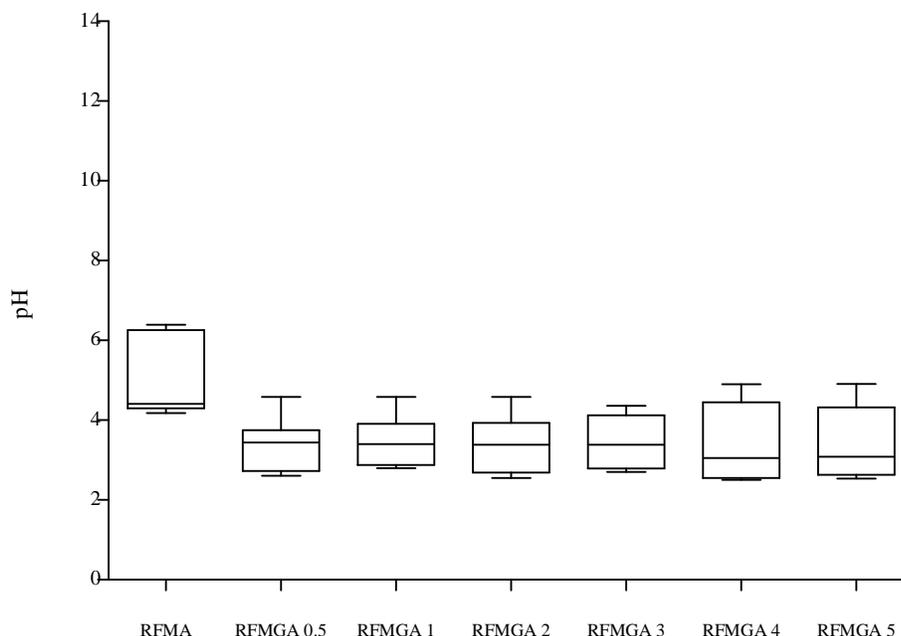


Legenda: RFMA- Reator com ATZ, fungo e metanol; RFMGA 0,5- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 1- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 2- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 3- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 4 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 5 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Autora, 2016.

Em relação à variação de pH, os menores valores de pH encontrados foram de 4,2; 2,6; 2,8; 2,5; 2,7; 2,5 e 2,5, e os maiores foram 6,4; 4,6; 4,6; 4,6; 4,3; 4,9 e 4,9, nos RFMA, RFMGA 0,5, RFMGA 1, RFMGA 2, RFMGA 3, RFMGA 4 e RFMGA 5, respectivamente.

Observou-se que nos reatores em que foi adicionada glicose, houve tendência à acidificação (Figura 24), enquanto que nos reatores sem glicose, o pH aumentou. Esse comportamento pode ser explicado pelo consumo da glicose, visto que sua utilização pelos fungos leva a formação de ácidos orgânicos, os quais diminuem o pH do meio, como já relatado por Hatami, Younesi e Bahramifar (2015) em seus estudos.

Figura 24 – Variação de pH ao longo da batelada com biomassa dispersa de ATZ, com adição de metanol e variação de glicose.



Legenda: RFMA- Reator com ATZ, fungo e metanol; RFMGA 0,5- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 1- Reator com ATZ fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 2- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 3- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 4 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 5 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Assim como no presente estudo, Bettin (2010), quando avaliou a influência da variação de acidez e basicidade sobre a produção de lacase por fungos, observou que durante o consumo de glicose do meio, o pH tendeu a decair, assim como o oxigênio dissolvido, o que, segundo a autora, indicou maior atividade dos micro-organismos presentes no meio. Nesta pesquisa, os menores valores de pH foram acompanhados dos melhores percentuais de remoção de atrazina nos reatores com adição de glicose, a saber: 2,6; 2,8; 2,5; 2,7; 2,5 e 2,5 nos reatores RFMGA 0,5, RFMGA 1, RFMGA 2, RFMGA 3, RFMGA 4 e RFMGA 5, respectivamente, com nove dias de reação.

A presença de metanol na solução estoque de ATZ conferiu valores de DQO elevados no efluente sintético desta pesquisa e não foram observadas remoções significantes de matéria orgânica. Esta concentração elevada de matéria orgânica pode ter minimizado seu consumo, uma vez que Barker *et al.* (1992), em seu estudo, observaram que a presença do metanol poderia causar inibição da biodegradação devido à remoção de oxigênio gerada pela

utilização do referido álcool. Aparentemente, os fungos utilizaram a glicose em detrimento do metanol, o que pode ser explicado pela fácil assimilação do açúcar quando comparado com o álcool.

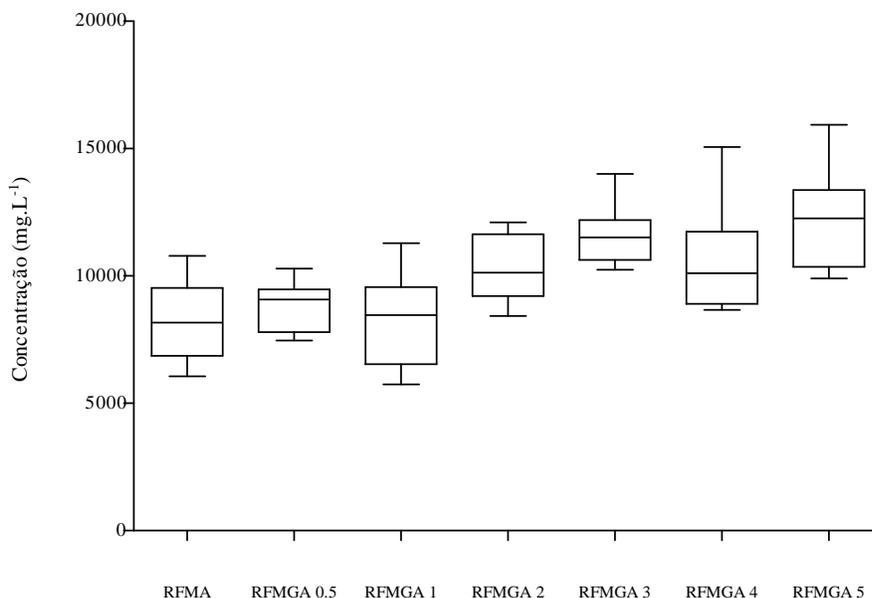
Outra possibilidade é a proposta por Kaline e Betiolo (2011). De acordo com os referidos autores, o fenol é um dos subprodutos esperados da reação de degradação da atrazina, devido ao anel aromático presente na molécula, e este, também, é um composto tóxico, que confere DQO ao meio. Como as remoções de atrazina foram elevadas, o fenol advindo da quebra da molécula de ATZ pode também ter contribuído para não decaimento da variável DQO.

Lopes *et al.* (2011) estudaram a remoção de fenóis por *Aspergillus niger* em reator operado em regime de batelada sequencial, e obtiveram percentual de remoção do poluente de 78%, usando  $1 \text{ g L}^{-1}$  (etapa I) de glicose como substrato, e 67%, usando  $5 \text{ g L}^{-1}$  (etapa II) de glicose. Os autores utilizavam efluente de indústria de castanha de caju *in natura* e concluíram que o aumento na concentração de cossustrato para os micro-organismos não influenciou em maiores valores de remoção de fenóis e de DQO (92%, e 93%, respectivamente etapas I e II), o que pode ser verificado neste estudo, visto que o aumento da concentração de glicose não acompanhou alcance de melhores remoções de atrazina e DQO.

Na Figura 25 pode-se inferir que a DQO tendeu a acumular-se no meio, principalmente nos reatores em que houve adição de maiores concentrações de glicose. As remoções de DQO nos reatores com ATZ foram de 22; 18; 40; 19; 15; 32 e 28% para os reatores sem glicose, com 0,5, 1, 3, 4 e  $5 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, com 9 dias de tratamento.

Outros autores já observaram comportamento semelhante. Silva *et al.* (2013), por exemplo, avaliando a capacidade do fungo *Cunninghamella elegans* em degradar fenatreno, um hidrocarboneto aromático policíclico, na concentração de 0,1 e 0,2 mM, em meio aquoso, verificaram que dentre as condições testadas de glicose como cossustrato ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$  e  $6 \text{ g L}^{-1}$ ), a melhor para remoção foi a de  $0,6 \text{ g L}^{-1}$ , com alcance de 82% de remoção de fenatreno, enquanto que a maior concentração provocou diminuição da atividade da espécie fúngica pelo excesso de substrato, o que pode ter ocorrido também neste trabalho.

Figura 25 – Concentração de DQO ao longo da batelada com biomassa dispersa de ATZ, com adição de metanol e variação de glicose.



Legenda: RFMA- Reator com ATZ, fungo e metanol; RFMGA 0,5- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 1- Reator com ATZ fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 2- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 3- Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 4 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGA 5 - Reator com ATZ, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Autora, 2016.

Nos estudos de Bettin (2010) analisou-se a influência da glicose na produção de lacase pelo fungo *Pleurotos sajor-caju*. A autora verificou a influência da variação da adição de 5, 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose ao meio, e observou que a concentração de 5 g L<sup>-1</sup> foi a condição que proporcionou maior produção de lacase, havendo diminuição da produção da enzima nas concentrações de 10 e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose. Assim como no presente trabalho, Bettin (2010) também objetivava encontrar uma condição ótima para o uso de uma espécie fúngica no processo de biotecnologia, e quando se compararam as condições de seu estudo com as deste trabalho, percebe-se comportamento semelhante no que se refere ao fato de que o excesso de glicose no meio pode diminuir a capacidade da espécie fúngica de consumir o substrato disponível, havendo então uma condição ótima para cada espécie, sob cada tipo de substrato usado.

Portanto, a adição de glicose ao meio influenciou para maior remoção de ATZ e matéria orgânica do efluente sintético, não sendo interessante uso das concentrações de 4 e 5

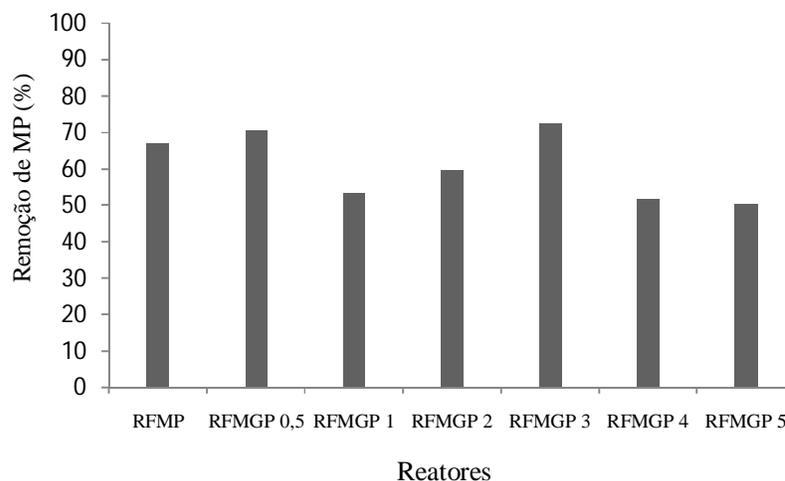
g L<sup>-1</sup> de glicose, tendo em vista que as concentrações de 1, 2 e 3 forneceram as melhores remoções de ATZ .

#### 4.3.1.2 Metil paration

No tocante ao consumo de metil paration nesta fase, o reator que proporcionou melhores percentuais de remoção de pesticida foi alcançada com 3 g L<sup>-1</sup> de glicose (RFMGP 3), com 72,5% de degradação de MP, o que corresponde à remoção de 21,6 mg L<sup>-1</sup> do inseticida. Entretanto, com apenas 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose (RFMGP 0,5), atingiu-se 70,5% de remoção de MP. Para os demais reatores, os percentuais obtidos com 9 dias de tempo reacional foram: 67,5%, 53%, 60% e 52% e 50%, reatores RFMP, RFMGP 1, RFMGP 2, RFMGP 4, RFMGP 5, respectivamente, conforme apresentado na Figura 26.

O decaimento do pesticida metil paration foi observado em todos os reatores utilizados no decorrer da etapa, e em todos os tempos reacionais. Mesmo nos reatores sem adição de glicose, apenas com a presença do metanol e do MP, obteve-se remoção de 20,2 mg L<sup>-1</sup> de pesticida do efluente.

Figura 26 – Remoção de MP com TR de 9 dias nas bateladas com biomassa dispersa, com adição de metanol e variação de glicose.



Legenda: RFMP- Reator com MP, fungo e metanol; RFMGP 0,5- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 1- Reator com MP fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 2 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 3- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 4 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 5 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>.  
Fonte: Autora, 2016.

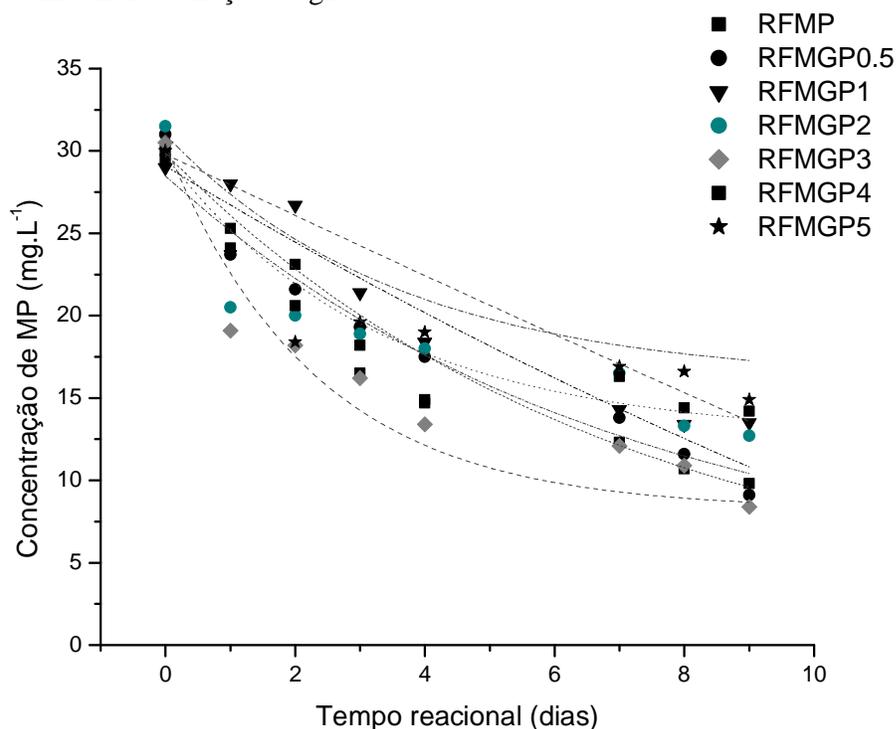
Quando se avaliou a velocidade do consumo do pesticida, o maior valor encontrado foi no reator com 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, conforme apresentado na Tabela 11, onde as reações obtidas seguiram o modelo de primeira ordem. Na Figura 27 estão apresentados os decaimentos observados nos reatores com MP na presença de metanol e glicose.

Tabela 11 – Velocidade de consumo de metil paration nos reatores em batelada dispersa com presença de metanol.

| Varição de glicose (g L <sup>-1</sup> ) | Velocidade (d <sup>-1</sup> ) | Valor do R <sup>2</sup> | Remoção de MP com 9 dias (%) |
|---|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| 0                                       | 0,272                         | 0,97                    | 67                           |
| 0,5                                     | 0,213                         | 0,97                    | 70,5                         |
| 1                                       | 0,131                         | 0,96                    | 53,5                         |
| 2                                       | 0,371                         | 0,98                    | 60                           |
| 3                                       | 0,403                         | 0,98                    | 72,5                         |
| 4                                       | 0,485                         | 0,97                    | 52                           |
| 5                                       | 0,540                         | 0,99                    | 50                           |

Fonte: Autora, 2016.

Figura 27 – Concentração da MP ao longo da batelada com biomassa dispersa, com adição de metanol e variação de glicose.



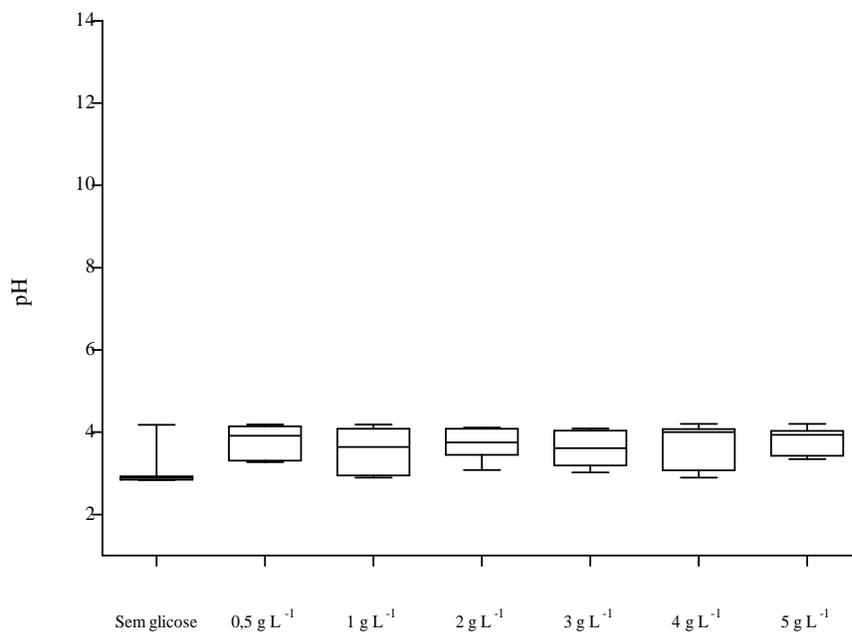
Legenda: RFMP- Reator com MP, fungo e metanol; RFMGP 0,5- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 1- Reator com MP fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 2 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 3- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 4 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 5 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Autora, 2016.

O reator com 5 g L<sup>-1</sup> de glicose obteve a maior velocidade de consumo de MP, o que sugere que o substrato de fácil assimilação pode promover maior velocidade de consumo de substratos quando os micro-organismos estão expostos a compostos reconhecidamente xenobióticos. No entanto, cabe mencionar que mesmo nos reatores sem adição de glicose houve remoção de 67% de metil paration, o que aponta para viabilidade do uso da espécie fúngica *Aspergillus niger*, visto que houve consumo do inseticida pela espécie, demonstrando assim afinidade pelo substrato.

No trabalho desenvolvido por Silva (2013), o autor avaliou a capacidade das espécies *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Aspergillus sydowii* 1241, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Penicillium raistrickii* CBMAI 1235 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 em degradar clorpirifós, metil paration e profenós. O estudo foi realizado em meio líquido sintético com 50 mg L<sup>-1</sup> dos pesticidas organofosforados, durante trinta dias. As maiores remoções encontradas foram de 72% de clorpirifós pela espécie *A. sydowii* CBMAIA 935 e de 100% de remoção de profenós pela *P. raistrickii* com 30 dias de experimento. O metil paration foi completamente degradado por *A. sydowii* CBMAIA 935 e *P. decaturense* em 20 dias. No presente estudo, a maior remoção do MP foi de 72,5% em nove dias de reação, o que sugere potencial de utilização da espécie *A.niger*.

A variável pH diminuiu em todos os reatores ao longo do experimento, como ilustrado na Figura 28. A diminuição mais acentuada foi observada no reator sem adição de glicose, no qual o pH de caracterização foi de 4,18 e com 24 h de experimento, este diminuiu para 2,93, permanecendo nessa faixa até o final das bateladas, o que pode ter ocorrido pelo maior consumo do MP, visto que o consumo do pesticida e de DQO foi maior que nos reatores com 0,5 e 1 g L<sup>-1</sup> de glicose .

Figura 28 – Variação de pH ao longo da batelada com biomassa dispersa de MP, com adição de metanol e variadas concentrações de glicose.



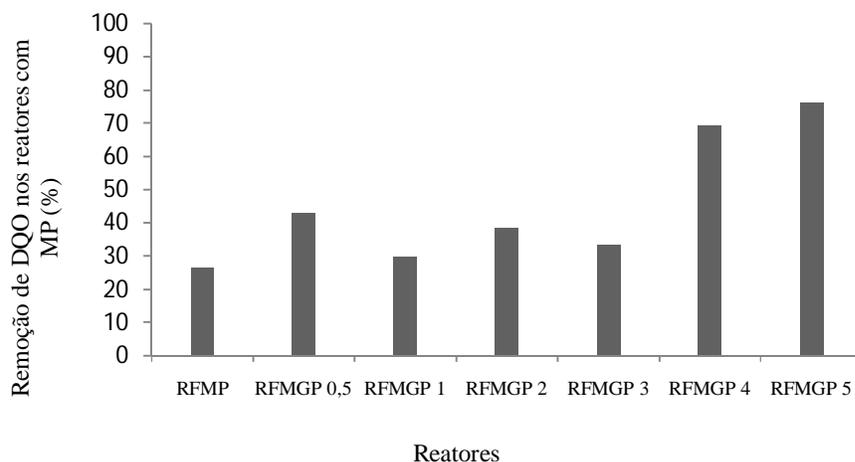
Fonte: Autora, 2016.

Nos reatores RFMGP 0,5, RFMGP 1, RFMGP 3, RFMGP 4 e RFMGP 5, os valores mínimos de pH encontrados foram: 3,27; 2,9; 3,08; 3,2; 2,90 e 3,35, respectivamente. O comportamento da variável pH configurou condição propícia para a não ocorrência da hidrólise do MP, visto que o pesticida, em meio com pH alcalino favorece a hidrólise do metil paration a paroxon (SILVA, 2013), o que indicou que a diminuição do MP no reatores foi provocada pelo consumo dos fungos e não por fatores abióticos.

Em termos de DQO, a concentração de caracterização foi de 10294, 10580, 11252, 12424, 13203, 14456 e 15499 mg L<sup>-1</sup>, para os reatores RFMP, RFMGP 0,5, RFMGP 1, RFMGP 2, RFMGP 3, RFMGP 4 e RFMGP 5, respectivamente. Os menores valores encontrados de DQO no efluente foram de 5930 e 5177 mg L<sup>-1</sup>, nos reatores sem glicose e com 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

As remoções de DQO nos reatores com metil paration foram de 27; 43; 30; 39; 33,5; 69 e 76% para os reatores sem glicose, com 0,5, 1, 3, 4 e 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, respectivamente. Na Figura 29 estão apresentados os percentuais de remoção de DQO.

Figura 29 - Remoção de DQO com TR de 9 dias nas bateladas com biomassa dispersa, com adição de metanol e variação de glicose.



Legenda: RFMP- Reator com MP, fungo e metanol; RFMGP 0,5- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 1- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 2 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 3- Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 4 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFMGP 5 - Reator com MP, fungo, metanol e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>.  
Fonte: Autora, 2016.

A não diminuição da matéria orgânica, expressa em termos de DQO, pode ser advinda da dificuldade do consumo do metanol no meio, pois elevada concentração de matéria orgânica pode levar a repressão enzimática dos fungos.

Comportamento semelhante nos reatores com metanol e atrazina foi observado, o que leva ao indício de que mesmo ocorrendo degradação dos pesticidas, o excesso de metanol pode comprometer o consumo de matéria orgânica do efluente.

#### 4.3.2 Fase 2 – Ausência do metanol com variações da concentração de glicose

Nesta fase do estudo retirou-se o metanol da água residuária sintética e a variação da glicose continuou, com uso das concentrações de 0,5, 1, 2, 3, 4 e 4 g L<sup>-1</sup>.

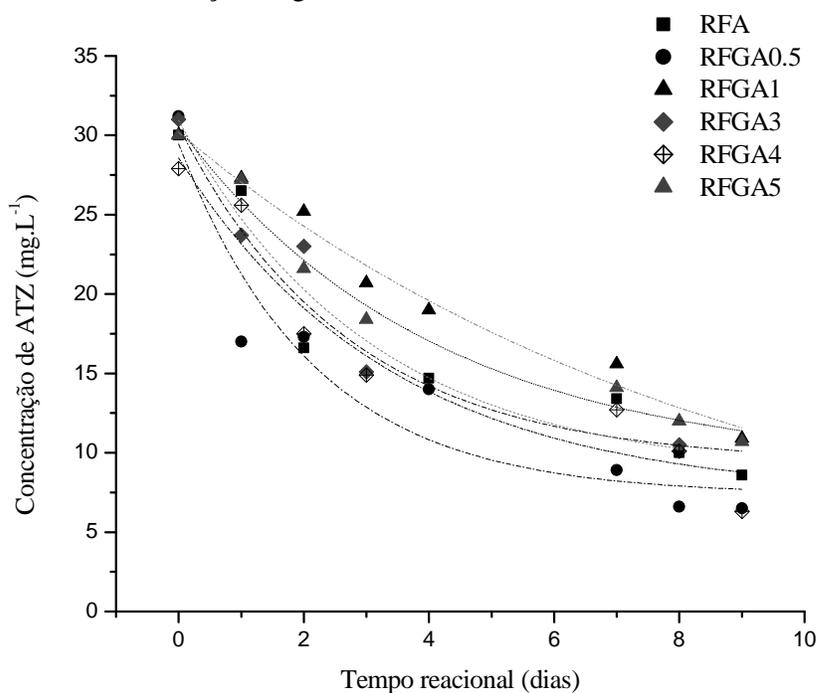
##### 4.3.2.1 Atrazina

As menores concentrações de ATZ encontradas nos efluentes dos reatores sem adição de metanol foram de 8,6; 6,5; 10,9; 13,8; 17,6; 6,3 e 10,7 mg L<sup>-1</sup> de pesticida, nos reatores RFA, RFGA 0,5, RFGA 1, RFGA 2, RFGA 3, RFGA 4 e RFGA 5, respectivamente,

ao final do TR de 9 dias. O consumo da atrazina obedeceu decaimento de reação de primeira ordem, a exceção dos reatores RFGA 2, os quais não seguiram reação de ordem zero ou de primeira ordem. O decaimento da concentração de atrazina nos reatores está apresentado na Figura 30.

A partir do estudo desse comportamento, realizou-se o cálculo da velocidade de consumo do pesticida, o qual está apresentado na Tabela 12.

Figura 30 - Concentração de ATZ ao longo da batelada com biomassa dispersa, sem adição de metanol e variação de glicose.



Legenda: RFA – Reator com ATZ, fungo; RFGA 0,5 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFGA 1 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFGA 2 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFGA 3 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFGA 4 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFGA 5 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Elaboração própria, 2016.

Tabela 12 – Velocidade de consumo de ATZ nos reatores em batelada dispersa sem presença de metanol e variadas concentrações de glicose.

| Varição de glicose (g L <sup>-1</sup> ) | Velocidade (d <sup>-1</sup> ) | Valor do R <sup>2</sup> | Remoção de ATZ com 9 dias (%) |
|---|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 0                                       | 0,370                         | 0,94                    | 71                            |
| 0,5                                     | 0,465                         | 0,92                    | 79                            |
| 1                                       | 0,114                         | 0,98                    | 64                            |
| 3                                       | 0,324                         | 0,95                    | 43                            |
| 4                                       | 0,293                         | 0,93                    | 77                            |
| 5                                       | 0,248                         | 0,98                    | 64                            |

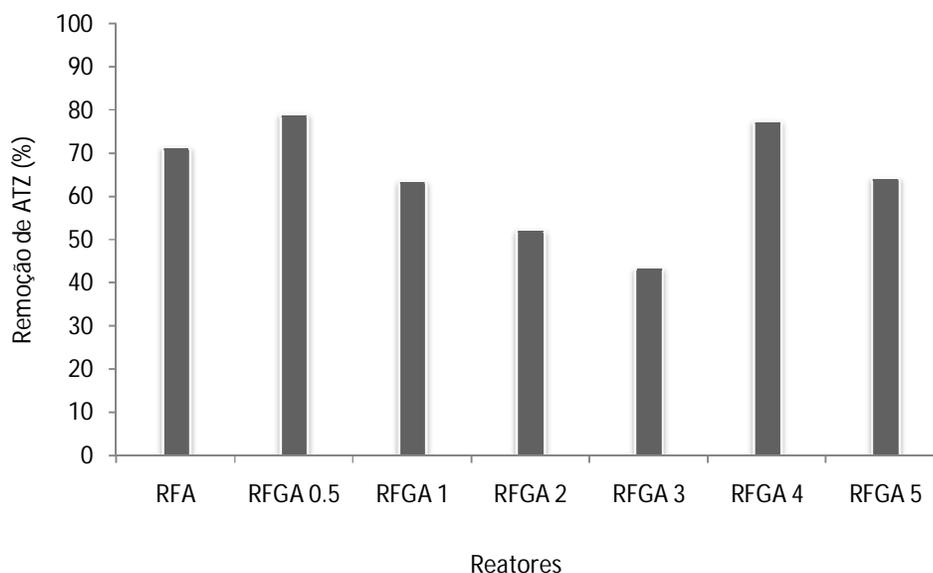
Fonte: Autora, 2016.

A maior velocidade foi encontrada no reator com 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, onde houve remoção de 79% de ATZ, o que pode indicar que a espécie fúngica utilizada no presente estudo não precisou de maiores concentrações de glicose para degradar a molécula de ATZ do meio.

Kist (2013) utilizou as espécies *Pleurotus floridae* e *Pleurotus ostreatus* para biodegradação de compostos nitroaromáticos presentes em efluente de água vermelha (fabricação de explosivos) e observou que o ensaio contendo o fungo *Pleurotus floridae*, a pH 6 com 10 g L<sup>-1</sup> de glicose e com efluente diluído a 0,5%, foi aquele que apresentou remoção de 100% de 2,6-dinitrotolueno, em 8 dias. O referido autor obteve 10 g L<sup>-1</sup> de glicose como condição ótima para o consumo do 2,6-dinitrotolueno, enquanto que na presente pesquisa a maior velocidade e maior remoção do poluente foram obtidas com 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, indicando então que o uso da espécie *A.niger* para consumo de compostos de difícil degradação pode ser uma alternativa.

As remoções de atrazina para esta fase da pesquisa foram de 71, 79, 64, 52, 43, 77 e 64%, para os reatores RFA, RFGA 0,5, RFGA 1, RFGA 2, RFGA 3, RFGA 4 e RFGA 5, respectivamente, conforme apresentado na Figura 31.

Figura 31 – Remoção de ATZ com TR de 9 dias nas bateladas com biomassa dispersa, sem adição de metanol e variadas concentrações de glicose.



Legenda: RFA – Reator com ATZ, fungo; RFGA 0,5 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFGA 1 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFGA 2 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFGA 3 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFGA 4 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFGA 5 - Reator com ATZ, fungo e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Autora, 2016.

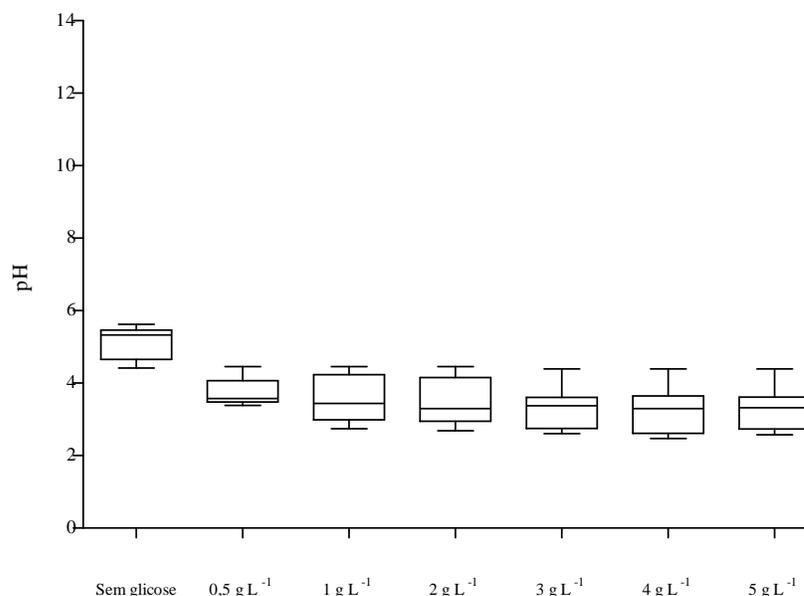
Sampaio (2005) analisou a capacidade do *Aspergillus niger* de degradar a atrazina de um efluente sintético. A autora usou o herbicida nas concentrações de 1,5 a 11,13 mg L<sup>-1</sup> em reatores em batelada com biomassa dispersa e verificou também a influência da glicose (0,5 g L<sup>-1</sup>). O maior percentual de remoção encontrado pela autora foi de 45% com 24 h de tempo de reação nos reatores em que houve adição de glicose e a concentração de ATZ foi de 1,5 mg L<sup>-1</sup>. Na presente pesquisa a remoção de ATZ nos reatores em que houve adição de 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose foi de 79%, com 9 dias de contato, o que pode indicar que o aumento no tempo de contato do poluente com o micro-organismo pode possibilitar alcance de melhores percentuais de remoção.

Sobre comportamento do pH observou-se que o efluente tendeu a acidez nos reatores em que houve adição de glicose, no entanto, no reator em que apenas a ATZ estava presente como fonte de carbono, houve aumento de pH. Na Figura 32 está apresentada a variação do pH ao longo dos tempos reacionais nos reatores operados durante a pesquisa.

O aumento do pH nos reatores sem adição de glicose pode estar atrelado ao fato de que durante o processo de assimilação de compostos que possuem o anel aromático, o pH

se eleva pela liberação de produtos hidroxilados, como metil, glusídeos e alguns intermediários da xilose, dentre outros, conforme relatou Prenafeta-Boldú (2002).

Figura 32 – Variação de pH ao longo da batelada com biomassa dispersa de ATZ, sem adição de metanol.



Fonte: Autora, 2016.

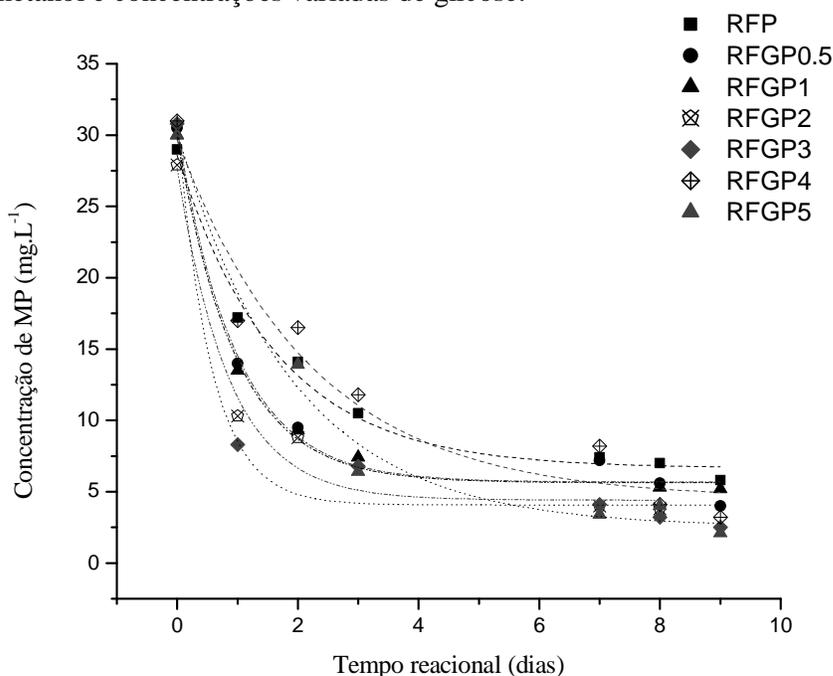
A glicose também é quantificada em termos de DQO. Nos reatores, houve variação de DQO entre 514 mg L<sup>-1</sup>, no reator sem glicose com 24h de reação, a 6861 mg L<sup>-1</sup>, com reator com 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, na caracterização. Os valores mínimos encontrados na água sintética depois do tratamento foram: 514, 739, 1212, 2228, 3460, 4329 e 5356 mg L<sup>-1</sup> de DQO, e os maiores valores foram: 758,5, 1407, 2267, 5068, 4417, 5629, 6861 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente para os reatores RFA, RFGA 0,5, RFGA 1, RFGA 2, RFGA 3, RFGA 4 e RFGA 5. A variação de DQO nos reatores, culminou em remoção de 29,3; 47,5; 46,55; 35,2; 22; 14,5 e 11,4%, para os RFA, RFGA 0,5, RFGA 1, RFGA 2, RFGA 3, RFGA 4 e RFGA 5, respectivamente.

Os melhores percentuais de remoção foram obtidos nos reatores com 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, com 47,5% e naqueles com 1 g L<sup>-1</sup>, com 46,5%, ambos no 9º dia de operação do reator. Uma possível explicação para a baixa remoção de DQO no meio é que a quebra parcial da molécula da atrazina gera fenol, o qual continua a contabilizar DQO, e só a partir dessa geração de fenol é que a ATZ será mineralizada (KALINE; BETIOLO, 2011).

#### 4.3.2.2 Metil paration

A concentração de metil paration decaiu em todos os reatores estudados nessa fase (sem adição de metanol), seguindo o modelo de primeira ordem, conforme mostrada na Figura 33. As menores concentrações encontradas foram de 5,8; 4; 4,6; 3,8; 2,5; 3,2 e 2,1 mg L<sup>-1</sup> de pesticida, nos reatores RFP, RFGP 0,5, RFGP 1, RFGP 2, RFGP 3, RFGP 4 e RFGP 5, respectivamente.

Figura 33 – Concentração de MP ao longo da batelada com biomassa dispersa, sem adição de metanol e concentrações variadas de glicose.



Legenda: RFP – Reator com MP, fungo; RFGP 0,5 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFGP 1 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFGP 2 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFGP 3 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFGP 4 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFGP 5 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Autora, 2016.

Observou-se que as menores concentrações no efluente dos reatores foram encontradas com o maior tempo de contato entre a espécie fúngica e o efluente sintético, no último dia de operação dos reatores, com 9 dias.

Assim como nos reatores com atrazina, a cinética de consumo de MP seguiu o modelo de primeira ordem, e verificou-se que os reatores que obtiveram a maior velocidade foram aqueles com adição de 3 g L<sup>-1</sup> de glicose, com 1,85 d<sup>-1</sup>, conforme Tabela 13.

Tabela 13 – Velocidade de consumo de metil paration nos reatores em batelada dispersa sem presença de metanol.

| <b>Varição de glicose (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Velocidade (d<sup>-1</sup>)</b> | <b>Valor do R<sup>2</sup></b> | <b>Remoção de MP com 9 dias (%)</b> |
|--|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 0  | 0,56                               | 0,98                          | 81                                  |
| 0,5  | 1,06                               | 0,97                          | 87                                  |
| 1  | 1,01                               | 0,99                          | 83                                  |
| 2  | 1,25                               | 0,98                          | 84                                  |
| 3  | 1,85                               | 0,98                          | 92                                  |
| 4  | 0,38                               | 0,98                          | 89                                  |
| 5  | 0,51                               | 0,98                          | 93                                  |

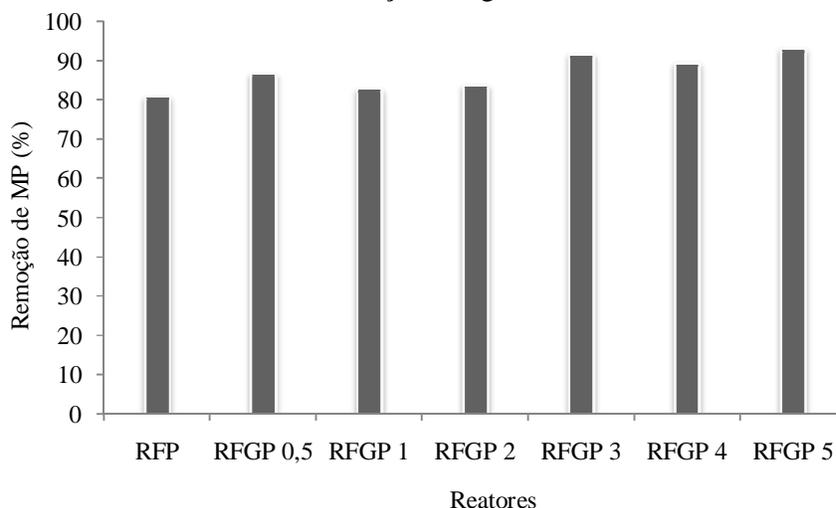
Fonte: Autora, 2016.

A menor velocidade de consumo de metil paration foi observada no reator com adição de 4 g L<sup>-1</sup> de glicose, sendo acompanhada pelo reator com 5 g L<sup>-1</sup> de glicose e pelo sem glicose. A partir desse comportamento pode-se ratificar a hipótese de que os fungos possuem condições ótimas a partir da disponibilidade de carbono e do poluente a que estão sendo expostos, conforme relatado por Chu, Feng e Yuan (2011).

O máximo percentual de remoção do MP obtido foi de 93% no reator contendo 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, com nove dias de operação, como pode ser melhor visualizado na Figura 34. As menores remoções ocorreram nos reatores sem adição de glicose, 42,6% e nos RFGP 4, com 43% do pesticida metil paration, ambos com 24 h de tempo reacional.

Os resultados obtidos com os reatores que não tiveram a adição de metanol no meio corroboram com a hipótese de que o referido álcool pode ter dificultado a remoção do MP do efluente, visto que em nenhum reator da batelada contendo metanol, na fase anterior, houve remoção superior ou próxima às encontradas na batelada sem metanol, agora discutida. Desta forma, o metanol influenciou negativamente na degradação do MP, enquanto que o uso de glicose favoreceu o decaimento do inseticida, assim como proporcionou maior velocidade de seu consumo.

Figura 34 - Remoção de MP ao longo da batelada com biomassa dispersa, sem adição de metanol e variadas concentrações de glicose.



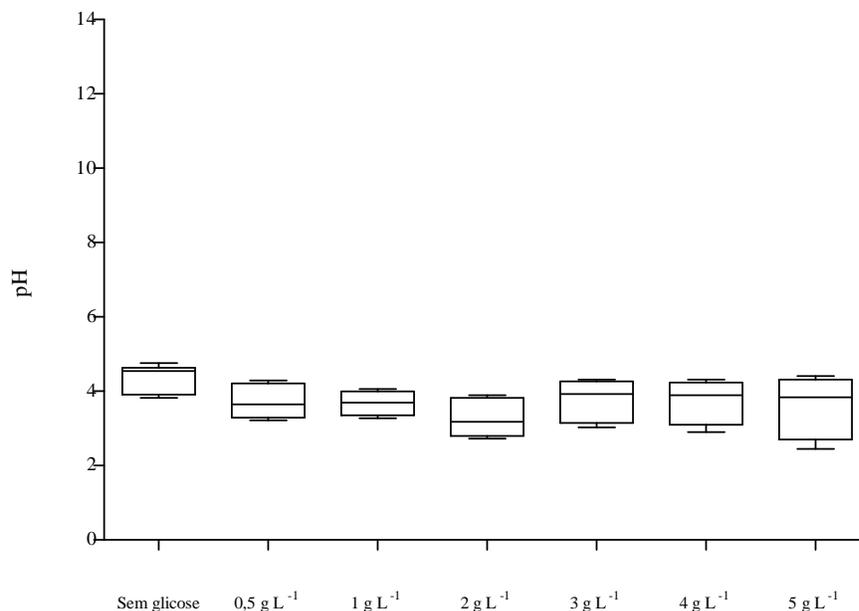
Legenda: RFP – Reator com MP, fungo; RFGP 0,5 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>; RFGP 1 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 1 g L<sup>-1</sup>; RFGP 2 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>; RFGP 3 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 3 g L<sup>-1</sup>; RFGP 4 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 4 g L<sup>-1</sup>; RFGP 5 - Reator com MP, fungo e glicose na concentração de 5 g L<sup>-1</sup>. Fonte: Autora, 2016.

O pH apresentou comportamento semelhante aos demais experimentos, sendo que a exceção daqueles que não tiveram adição de glicose, houve diminuição ao longo dos tempos reacionais. O menor valor encontrado foi de 2,5 nos reatores com 5 g L<sup>-1</sup> de glicose, no último dia de operação dos reatores (9 dias) e o maior foi 4,8, nos reatores sem glicose, também com nove dias de operação, como apresentado na Figura 35.

O aumento do pH nos reatores sem glicose pode ser devido ao consumo de ácidos no meio, pois de acordo com Raimbault (1998), o aumento do pH é atribuído a alcalinização do meio via retirada dos ácidos presentes. Cabe mencionar que mesmo com esse aumento, a faixa de pH nos RFP ainda manteve-se em meio ácido.

Em estudo desenvolvido por Chen *et al.* (2012), os autores avaliaram a capacidade da espécie *Cladosporium cladosporioides* Hu-01 em degradar o pesticida clorpirifós, inseticida organofosforado largamente utilizado no mundo. Os melhores resultados de remoção dos poluentes encontrados no referido estudo foram identificados em pH ácido, o que, de acordo com os autores, confere uma vantagem à utilização de fungos no tratamento de compostos recalcitrantes, o que também pode ser observado na presente pesquisa.

Figura 35 – Variação de pH ao longo da batelada com biomassa dispersa de MP, sem adição de metanol e variadas concentrações de glicose.



Fonte: Elaboração própria, 2016.

Na análise da remoção de DQO nos reatores com metil paration, sem adição de metanol, as remoções observadas foram de 25, 26, 8,5, 12 e 18,5%, respectivamente nos RFP, RFGP 0,5, RFGP 1, RFGP 4 e RFGP 5, não sendo observada remoções nos reatores com adição de 2 e 3 g L<sup>-1</sup> de glicose.

Usharani e Muthukumar (2013) utilizaram a espécie *Fusarium sp* para verificar sua capacidade de degradar metil paration de matriz aquosa. Os autores trabalharam com a concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>, pH 6,5, DQO inicial de 41,95 mg L<sup>-1</sup> em erlenmeyers de 250 mL, a 120 rotações por minuto, durante 144 h. O resultado obtido, em termos de remoção de MP foi de 93% e para DQO a remoção foi de 80%. A baixa remoção de DQO nesta pesquisa, em comparação ao estudo acima reportado, pode estar atrelada à grande disponibilidade de fonte de fácil assimilação de carbono, pois as maiores remoções de DQO foram verificadas nos reatores RFP e RFGP 0,5.

#### 4.4 Etapa V - Reator em bateladas sequenciais (RBS)

As concentrações de glicose utilizadas nesta etapa foram baseadas naquelas usadas nas bateladas com biomassa dispersa e com variação de glicose, o que indicou uso inicial dos valores de 0,5, 1 e 2 g L<sup>-1</sup> de glicose.

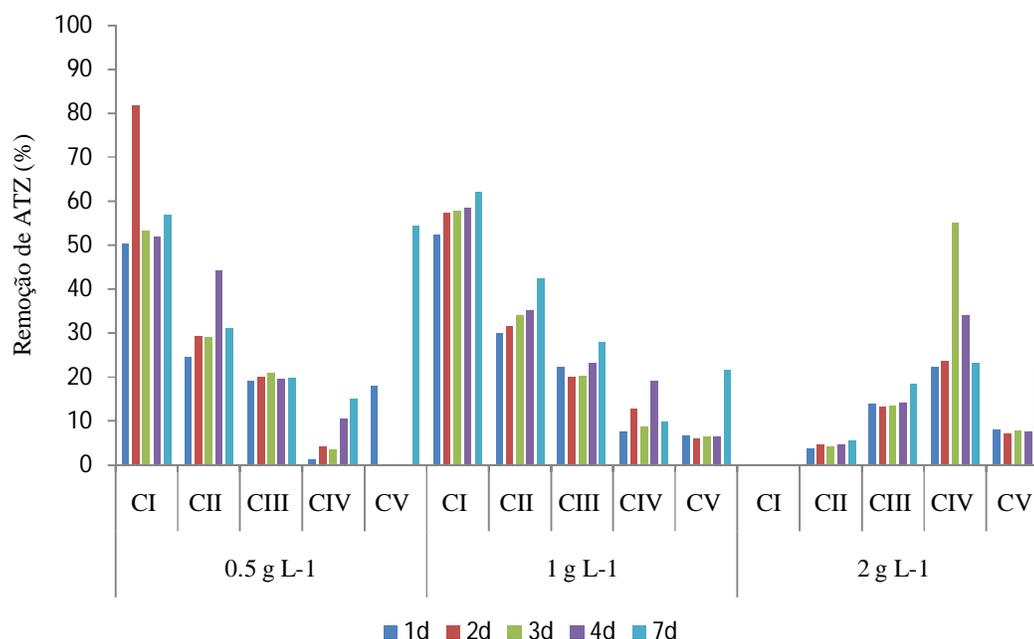
##### 4.4.1 Atrazina

A imobilização da espécie fúngica proporcionou remoções médias de remoção de atrazina de 59 ± 11,7, 32 ± 6,6, 20 ± 0,6, 7 ± 5,1 e 14,5 ± 21,2% para os ciclos I, II, III, IV e V, respectivamente, com 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose como co substrato. Para a condição de 1 g L<sup>-1</sup> de glicose, as médias de remoção foram de 58 ± 3,1, 35 ± 4,3, 23 ± 2,8, 11,5 ± 4,1 e 9,5 ± 6,1% para os ciclos I, II, III, IV e V, respectivamente.

A condição menos favorável para degradação do poluente foi o incremento de 2 g L<sup>-1</sup> de glicose ao efluente sintético, visto que no primeiro ciclo de operação sob a referida condição, não houve remoção de atrazina do meio. O processo de dessorção foi observado em todos os tempos estudados do ciclo I, havendo incremento na concentração de ATZ durante o referido ciclo. Os ciclos II, III, IV e V obtiveram média de 4,5 ± 0,6, 15 ± 1,9, 32 ± 12,5 e 11 ± 6% de remoção, respectivamente. Na Figura 36 estão apresentadas as variações de remoção média obtidas no reator com biomassa imobilizada.

A imobilização de biomassa em reatores apresentou-se como alternativa de incremento nos percentuais de remoção de poluentes deste estudo, como os de Sharma e Gupta (2012) e Rodriguez *et al.* (2009). Dentre as principais vantagens para os micro-organismos, têm-se, minimização de toxicidade, melhor crescimento, maiores probabilidades de sobrevivência e pode intensificar a produção de ácidos quando comparados à processos feitos com células ou esporos livres. No entanto, na presente pesquisa, essa hipótese não foi verificada, visto que os percentuais de remoção da etapa com biomassa dispersa foram superiores à etapa com imobilização dos esporos, inclusive naquela em que houve presença de metanol no meio.

Figura 36 – Percentual de remoção de ATZ nos ciclos de I a V, com as concentrações de glicose 0,5 g L<sup>-1</sup>, 1 g L<sup>-1</sup> e 2 g L<sup>-1</sup> no reator com ATZ, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.



Fonte: Autora, 2016.

Observou-se que a proposição de Sharma e Gupta (2012), que consistiu em afirmar que a imobilização da espécie *A. niger* em processos de batelada possui desempenho superior àquele que utiliza células livres, não pode ser corroborada. Os autores atribuíram o melhor desempenho da espécie fúngica à diminuição do tempo de adaptação ao poluente em que o micro-organismo foi exposto, fenol no referido caso.

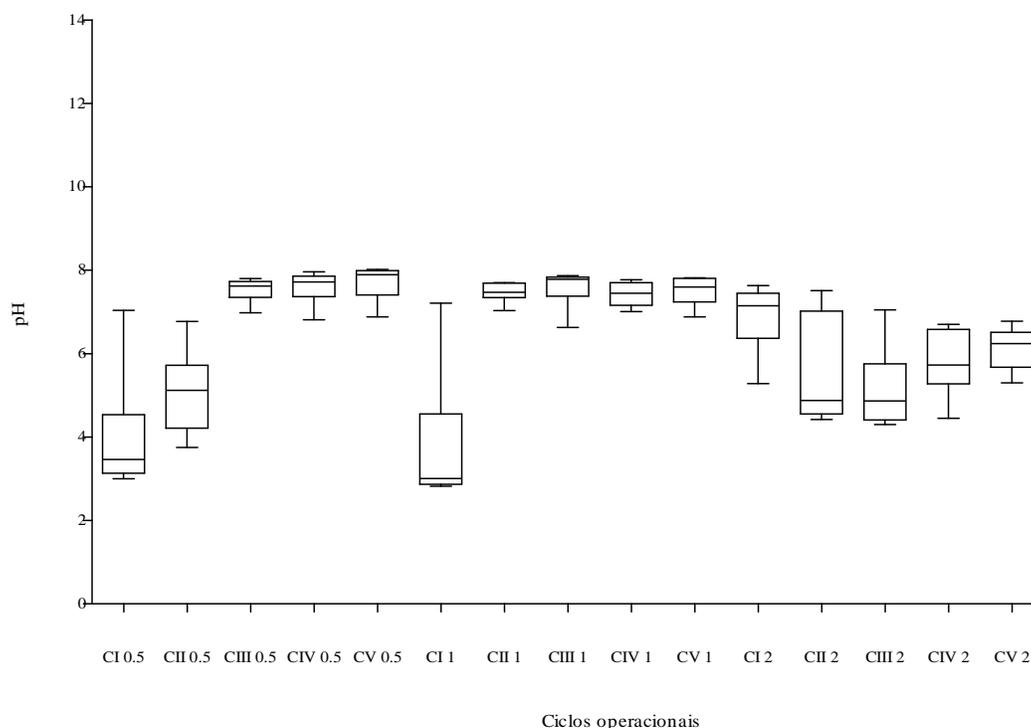
As menores concentrações registradas no efluente nesta etapa da pesquisa, foram de 12 mg L<sup>-1</sup> no ciclo I e 13,9 mg L<sup>-1</sup> no ciclo V com 1 g L<sup>-1</sup> de glicose e 12,9 mg L<sup>-1</sup> no ciclo I com 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose. As maiores foram registradas na etapa com presença de 2 g L<sup>-1</sup> de glicose. Esse comportamento pode indicar que a maior disponibilidade de carbono de fácil assimilação pode não ter sido suficiente para promover melhor desempenho da espécie fúngica.

Ao contrário da presente pesquisa, Fontana e Silveira (2012) relataram que a presença de glicose favoreceu o crescimento celular de *Aspergillus oryzae* e, em consequência, poderia subsidiar melhores remoções de poluentes, assim como maior produção de subprodutos de interesse econômico, como ácido cítrico. É salutar mencionar que o estudo reportado utilizou meio sintético com variação de glicose e pectina para produção de

enzimas endo e exo poligalacturonase, um meio sem adição de compostos considerados recalcitrantes, fato que pode indicar o resultado diferente ao deste estudo.

Sobre a variação de pH, observou-se valor médio de entrada da água sintética de  $6,9 \pm 0,17$  ao longo dos 15 ciclos operacionais. Na Figura 37 está apresentada a variação do pH ao longo da operação do reator.

Figura 37 – Variação de pH nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  no reator com ATZ, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.



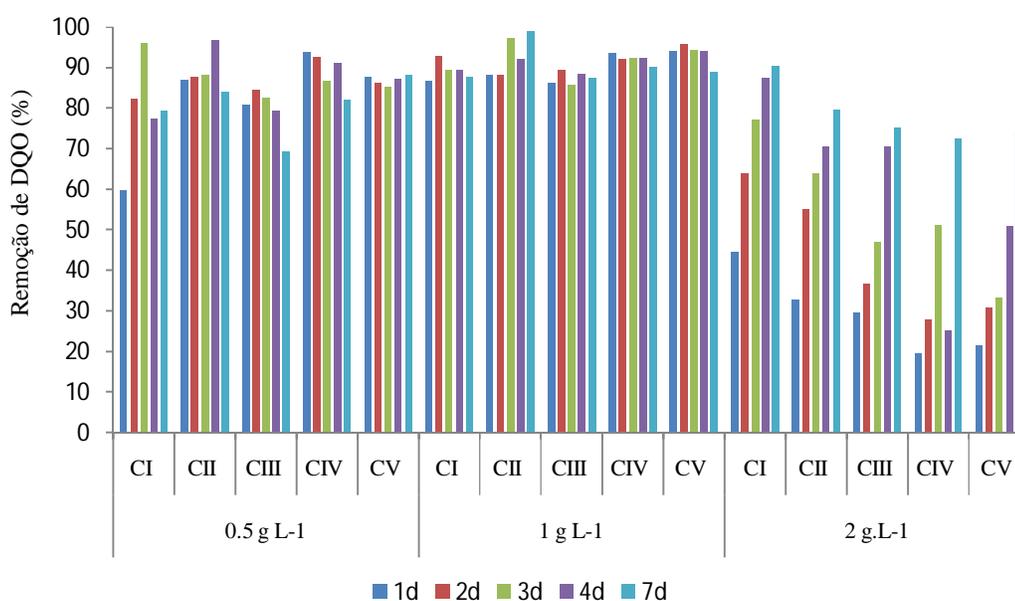
Fonte: Autora, 2016.

A acidificação do pH nas etapas com  $0,5$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glicose pode estar ligada ao consumo da atrazina e da DQO no efluente, uma vez que durante a degradação da atrazina, um dos subprodutos é a formação do ácido cianúrico -  $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_3$  (PEREIRA, 2011) e durante o consumo da glicose há a formação de ácidos orgânicos, podendo deixar assim o meio com caráter ácido.

Os menores valores de pH observados foram  $2,8$  (ciclo I com  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glicose),  $3$  e  $3,75$ , nos ciclos I e II com  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, e  $4,5$ ,  $4,3$  e  $4,5$  nos ciclos II, III e IV, com  $2 \text{ g L}^{-1}$ . Nos demais ciclos o pH manteve-se próximo da neutralidade. Nos primeiros ciclos de

cada etapa houve acidificação do meio, possivelmente pela maior disponibilidade de matéria orgânica, visto que a remoção de DQO foi elevada nas duas primeiras etapas, sendo observada média de remoção, por etapa, de  $85 \pm 5,11$ ,  $91 \pm 2,5$  e  $53 \pm 13,7\%$ , respectivamente com  $0,5$ ,  $1$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, conforme apresenta a Figura 38.

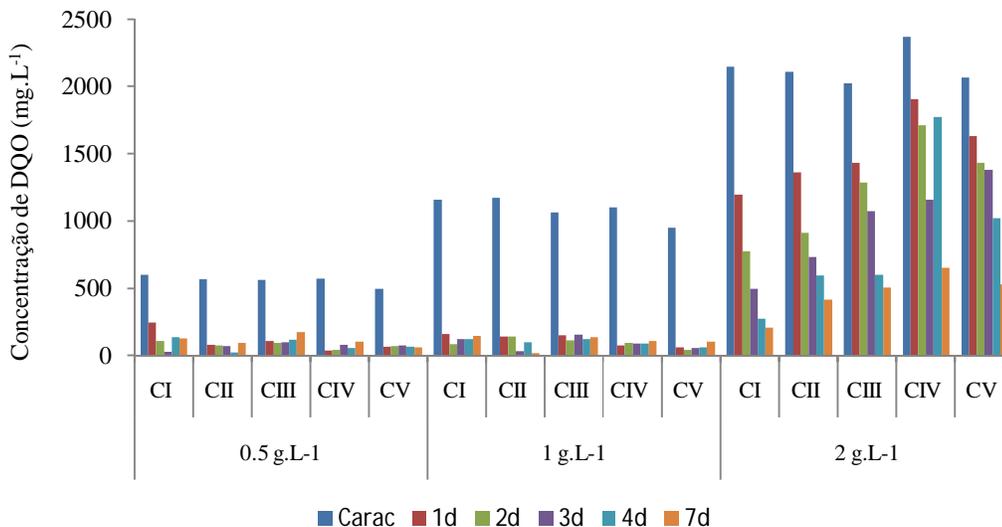
Figura 38 – Variação da remoção de DQO em termos de percentual nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  no reator com ATZ, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.



Fonte: Autora, 2016.

Na Figura 39 está a representação da concentração de matéria orgânica expressa em termos de DQO no efluente, a qual foi, em média de  $109,5 \pm 41,8$ ,  $100 \pm 29,5$ , e  $460 \pm 165,8 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente com  $0,5$ ,  $1$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  de glicose, sendo os referidos valores baseados nas concentrações do 7º dia de operação do reator ao longo de 5 ciclos operacionais. Todos os ciclos das etapas com  $0,5$  e  $1 \text{ g L}^{-1}$  estiveram com a concentração abaixo de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , valor limite estipulado pela Superintendência Estadual do Meio Ambiente do Ceará – SEMACE em sua Resolução 154/2002 para lançamento de efluentes industriais em rede coletora (CEARÁ, 2002).

Figura 39 – Variação da concentração de DQO nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  no reator com ATZ, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.



Fonte: Autora, 2016.

A imobilização das células da espécie *Aspergillus niger* AN 400 não foi preponderante para o alcance de maiores percentuais de remoção de ATZ, não sendo verificado também influência positiva da adição de glicose nas concentrações de  $1 \text{ e } 2 \text{ g L}^{-1}$  de glicose como fonte primária de carbono.

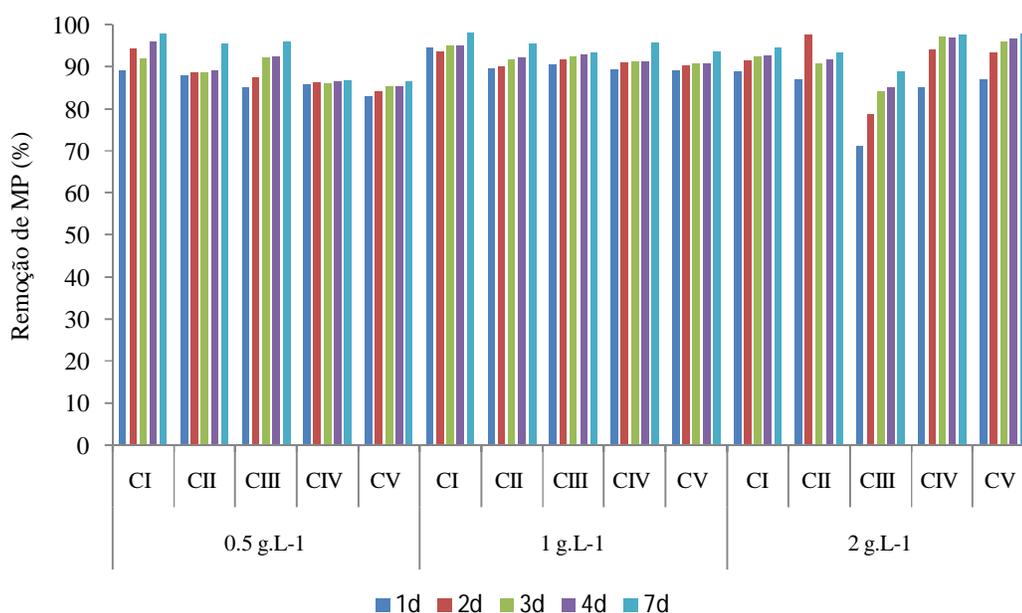
#### 4.4.2 Metil Paration

A concentração média afluyente de MP foi de  $30 \pm 0,76 \text{ mg L}^{-1}$  nos reatores com biomassa imobilizada de *A.niger* AN 400. As concentrações médias de MP analisadas no efluente final foram de  $2,2 \pm 1,64$ ,  $1,4 \pm 0,6$  e  $1,65 \pm 1,1 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente para as fases com adição de  $0,5$ ,  $1$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. No que se refere às etapas, aquela com adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glicose foi a que obteve menor concentração média de MP no efluente ( $1,4 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Em termos de remoção do MP, observou-se que a melhor condição para operação do reator fúngico foi quando houve adição de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de glicose no meio, com média de  $95 \pm 1,9\%$  de remoção, conforme mostrado na Figura 40. As demais etapas obtiveram médias de  $92,5 \pm 5,5\%$  e  $94,5 \pm 3,6\%$ , respectivamente para  $0,5$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Os percentuais de

remoção encontrados nesta etapa foram superiores aos obtidos com o tratamento com biomassa dispersa, sendo a maior média 92%, registrada durante o uso de 3 g L<sup>-1</sup> de glicose e sem adição de metanol ao meio.

Figura 40 – Percentual de remoção de MP nos ciclos de I a V, com as concentrações de glicose 0,5 g L<sup>-1</sup>, 1 g L<sup>-1</sup> e 2 g L<sup>-1</sup> no reator com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.



Fonte: Autora, 2016.

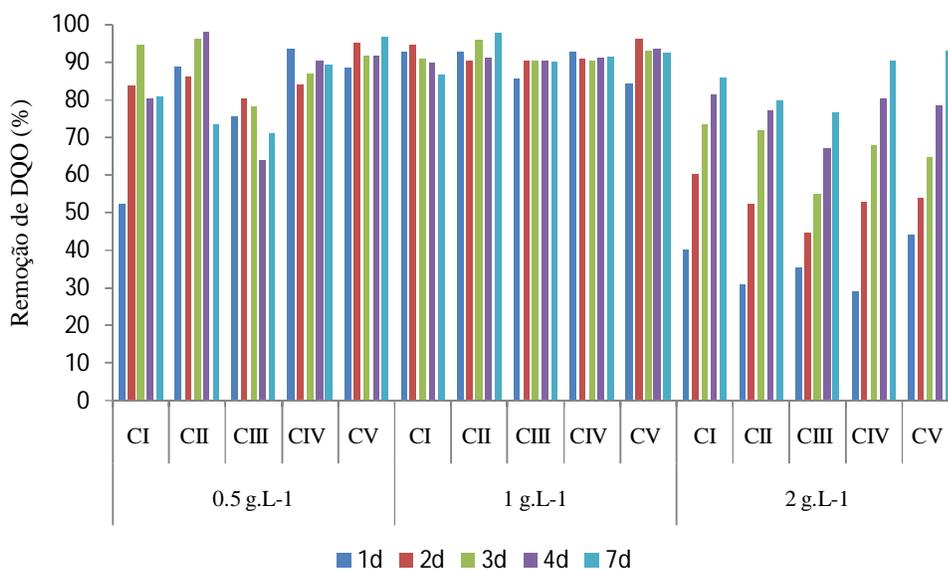
No tocante ao aspecto imobilização, o reator com MP comportou-se de modo diferente ao que continha atrazina, pois o processo de confinamento das células proporcionou melhoria no desempenho do processo em batelada, conforme previram Sharma e Gupta (2012). Essa diferença pode ser devida à maior afinidade do micro-organismo pelo MP em detrimento da ATZ.

Rodrigues (2013) analisou a remoção de MP de meio líquido por fungos marinhos, *Penicillium citrinum* e *Fusarium proliferatum*, isolados da ascídia *Didemnum ligulum*. A concentração utilizada pela autora foi de 30 mg L<sup>-1</sup> em erlenmeyres de 250 mL, com volume útil de 100 mL e agitação de 130 rpm ao longo de 10, 20 e 30 dias. Com 20 dias houve remoção total do MP, no entanto, a autora fez uma ressalva, visto que nos reatores abióticos a degradação foi similar àquela encontrada nos reatores com as espécies fúngicas. Esse resultado foi atribuído às condições de pH e temperatura, 8 e 32°C, respectivamente, as

quais propiciaram a hidrólise do MP a p-nitrofenol. No presente trabalho a hidrólise não foi favorecida, visto que o pH do meio tendeu sempre à acidez e a temperatura mantida foi temperatura ambiente,  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ , o que sugere que a degradação do poluente foi feita via mecanismos biológicos da espécie *A.niger*.

Os valores de remoção de DQO, assim como os de pesticida, também foram expressivos. A média de remoção de matéria orgânica do efluente foi de  $82 \pm 10,8$ ,  $92 \pm 4$  e  $85 \pm 7\%$ , respectivamente para as etapas com 0,5, 1 e 2 g L<sup>-1</sup> de glicose. Assim como para remoção do pesticida, a etapa com adição de 1 g L<sup>-1</sup> de glicose foi aquela em que houve melhor desempenho, como está apresentado na Figura 41.

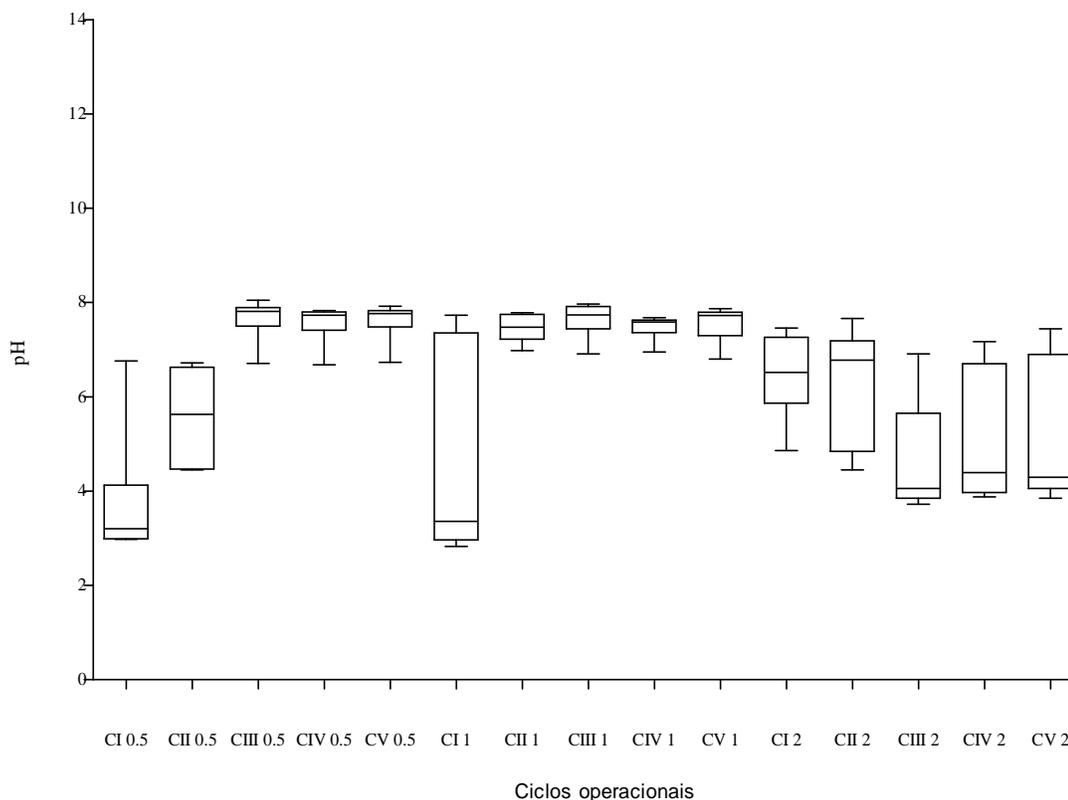
Figura 41 – Variação da remoção de DQO em termos de percentual nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose 0,5 g L<sup>-1</sup>, 1 g L<sup>-1</sup> e 2 g L<sup>-1</sup> no reator com metil paration, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.



Fonte: Autora, 2016.

O pH de entrada do reator com MP esteve, em média, em  $6,8 \pm 0,17$ , como apresentado na Figura 42. Ao longo dos ciclos operacionais observou-se que o pH final tendeu à neutralidade na maioria dos ciclos, à exceção do ciclo I com 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, ciclo I 1 g L<sup>-1</sup> de glicose, e com ciclo III, IV e V com 2 g L<sup>-1</sup> de glicose, sendo os valores encontrados, respectivamente, 2,9 com 24 e 48 h; 2,8 e 3,0 com 48 e 72 h e 3,7 e 3,9 nos tempos de 96 e 144 h no ciclo III, e 3,8 com 72 h nos ciclos IV e V.

Figura 42 – Variação de pH nos ciclos de I a V, nas as concentrações de glicose  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ,  $1 \text{ g L}^{-1}$  e  $2 \text{ g L}^{-1}$  no reator com MP, com biomassa imobilizada em espuma de poliuretano.



Fonte: Autora, 2016.

## 4.5 Etapa V - Planejamento experimental

### 4.5.1 Atrazina

O resultado obtido através do planejamento experimental pode ser visualizado na Tabela 14. Observou-se que o aumento na concentração de ATZ no afluente não resultou em maiores percentuais de remoção, enquanto que a glicose, nas concentrações testadas, pareceu não propiciar melhora no desempenho da espécie fúngica. A recalcitrância da ATZ já foi relatada por muitos trabalhos, a saber, Sampaio (2005), Henn (2009), Leme (2010), Pereira (2011), Xie *et al.* (2013), Kolekar *et al.* (2014), Vacondio (2014), e o resultado do planejamento fatorial para reatores com biomassa imobilizada comprovou sua difícil remoção por via biológica.

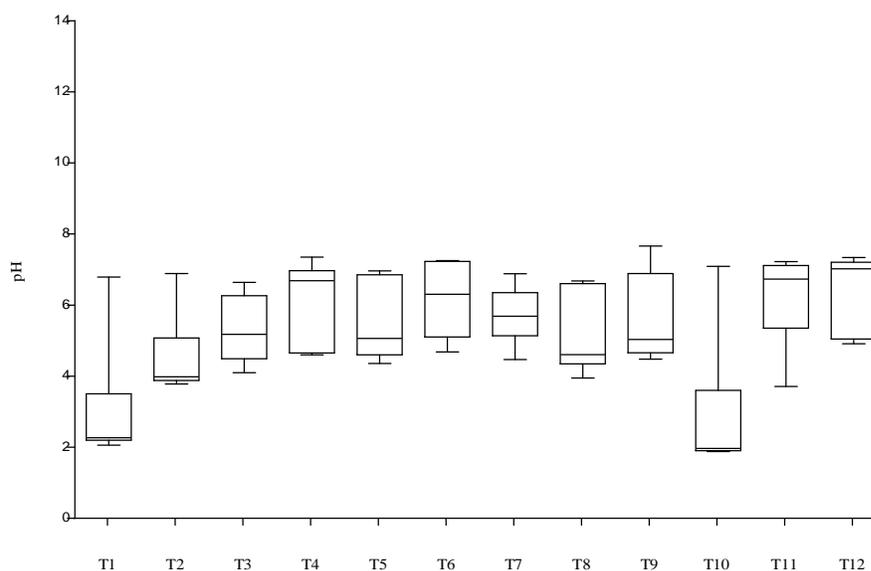
Tabela 14 – Remoção de atrazina nas condições do planejamento experimental.

| Teste* | Concentração de Glicose (g L <sup>-1</sup> ) | Concentração de ATZ no afluente (mg L <sup>-1</sup> ) | Remoção de ATZ (%) | Concentração removida (mg L <sup>-1</sup> ) |
|--------|--|---|--------------------|---|
| 1      | 2,75   | 5   | 80                 | 4 ± 0,45                                    |
| 2      | 0,5  | 5   | 40                 | 2 ± 0,6                                     |
| 3      | 2,75   | 17,5  | 34                 | 6 ± 3,1                                     |
| 4      | 2,75   | 17,5  | 34                 | 6 ± 6,3                                     |
| 5      | 2,75   | 30  | 27                 | 8 ± 4,6                                     |
| 6      | 2,75   | 17,5  | 40                 | 7 ± 3,5                                     |
| 7      | 5  | 30  | 27                 | 8 ± 7,9                                     |
| 8      | 5  | 17,5  | 23                 | 4 <sup>1</sup>                              |
| 9      | 0,5  | 17,5  | 17                 | 3 ± 2,1                                     |
| 10     | 5  | 5   | 60                 | 3 ± 0,85                                    |
| 11     | 0,5  | 30  | 73                 | 22 ± 8,8                                    |
| 12     | 2,75   | 17,5  | 17                 | 3 ± 1,7                                     |

Fonte: Autora, 2016. <sup>1</sup> Só houve remoção no último dia do ciclo.\* Cada teste ocorreu em uma semana, perfazendo total de 12 semanas.

O pH médio de entrada no reator com ATZ foi de  $6,8 \pm 0,16$ , ficando em meio ácido nos Testes 1, 2, 3, 7, 8 e 10. Nos demais Testes o pH ficou em torno da neutralidade, conforme Figura 43.

Figura 43 – Variação do pH no reator com ATZ, com biomassa imobilizada ao longo do planejamento experimental.



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

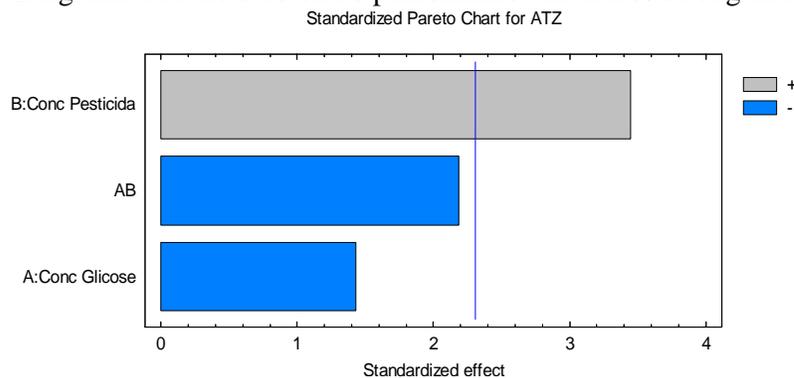
Os ciclos onde o pH ficou mais ácido foram aqueles em que a presença da glicose foi maior (2,75 e 5 g L<sup>-1</sup>), podendo esse fato corroborar com a hipótese de que a presença de glicose no meio pode levar à liberação de ácidos pelos fungos, além da proposição de Pereira (2011), que consiste na liberação de ácido cianúrico a partir do consumo de ATZ.

A exceção ao comportamento relatado acima foi o T2, no qual a concentração de glicose afluente foi de 0,5 g L<sup>-1</sup>. O pH do meio, ao final do último dia operação do reator foi de 4,5, podendo esse valor ser explicado tanto pela remoção de 40% de ATZ quanto pelos ácidos presentes restantes do ciclo anterior, no qual havia 5 g L<sup>-1</sup> e a remoção média de ATZ do meio foi de 80%.

Para analisar a significância do efeito da glicose e da concentração de ATZ foi gerado Diagrama de Pareto. A análise dos resultados encontrados ocorreu quando estes foram diferentes de zero; foi realizado o teste *t de Student*, com nível de confiança de 95%. No diagrama de Pareto, os valores que excederam a linha disposta na vertical foram aqueles considerados significantes, com 95% de confiança.

Na Figura 44, na qual está a representação da relação entre concentração de glicose e concentração de atrazina pelo Diagrama de Pareto, verificou-se que a concentração do pesticida influenciou diretamente nos percentuais de remoção. A partir do diagrama também foi possível perceber que a presença de glicose, no intervalo testado neste estudo, não influenciou de forma significativa o tratamento.

Figura 44 – Diagrama de Pareto do efeito padronizado em termos de degradação de ATZ.



Fonte: Autora, 2016.

Em acordo com o presente estudo, Tebbouche *et al.*(2015) avaliaram o potencial da espécie *Aspergillus niger* em degradar fenol de água residuária sintética e identificaram que a concentração do poluente alvo foi a única variável significativa para o tratamento. Os

autores usaram o planejamento fatorial para investigar a influência da concentração do poluente, do pH e da temperatura no processo. Ao final de 8 experimentos, observaram que a única variável que mais influenciou no processo foi a concentração do fenol, a qual variou entre  $100 \text{ mg L}^{-1}$  a  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 4.5.2 Metil paration

Os testes realizados no planejamento experimental apresentaram remoção de MP elevadas. Os percentuais, ao final dos testes foram de 94, 92, 97, 99, 97, 95, 98, 99, 95, 98,5, 99 e 94,5%, respectivamente para os testes T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11 e T12. Os percentuais obtidos de remoção do iseticida metil paration e sua concentração removida ao longo do testes estão elencados na Tabela 15. A condição em que houve maior remoção de metil paration foi aquela em que a concentração do pesticida foi de  $17,5 \text{ mg L}^{-1}$  e a glicose foi  $2,75 \text{ g L}^{-1}$ . Essa condição teve 4 repetições, e os percentuais de remoção obtidos foram de 95; 93; 93 e 87 %.

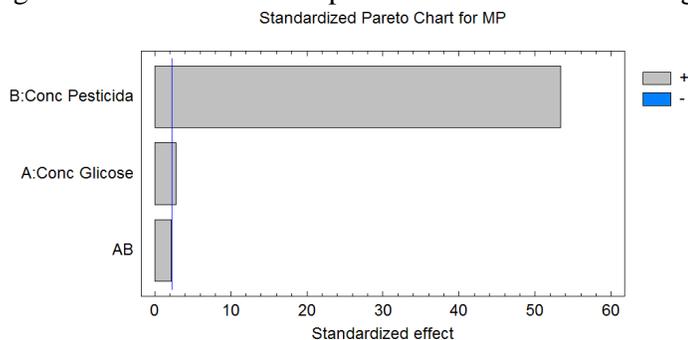
Tabela 15 – Remoção de metil paration nas condições do planejamento experimental.

| Teste* | Concentração de Glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) | Concentração de MP no afluente ( $\text{mg L}^{-1}$ ) | Remoção de MP (%) | Concentração removida ( $\text{mg L}^{-1}$ ) |
|--------|---|---|-------------------|--|
| 1      | 2,75  | 5   | 93                | $4,7 \pm 0,24$                               |
| 2      | 0,5   | 5   | 90                | $4,5 \pm 0,18$                               |
| 3      | 2,75  | 17,5  | 95                | $16,6 \pm 0,50$                              |
| 4      | 2,75  | 17,5  | 93                | $16,3 \pm 0,56$                              |
| 5      | 2,75  | 30  | 93                | $27,0 \pm 1,91$                              |
| 6      | 2,75  | 17,5  | 94                | $16,6 \pm 0,65$                              |
| 7      | 5   | 30  | 93                | $28,0 \pm 1,85$                              |
| 8      | 5   | 17,5  | 91                | $16,0 \pm 1,35$                              |
| 9      | 0,5   | 17,5  | 87                | $15,0 \pm 3,20$                              |
| 10     | 5   | 5   | 93                | $4,7 \pm 0,49$                               |
| 11     | 0,5   | 30  | 85                | $25,6 \pm 5,34$                              |
| 12     | 2,75  | 17,5  | 87                | $15,2 \pm 2,25$                              |

Fonte: Autora, 2016. \* Cada teste ocorreu em uma semana, perfazendo total de 12 semanas.

É válido ressaltar que as remoções obtidas nos doze testes foram consideradas elevadas, principalmente pela característica de recalcitrância do poluente. Na Figura 45 está a representação do gráfico de Pareto para o MP. É possível perceber que as variáveis estudadas influenciaram significativamente na remoção do composto.

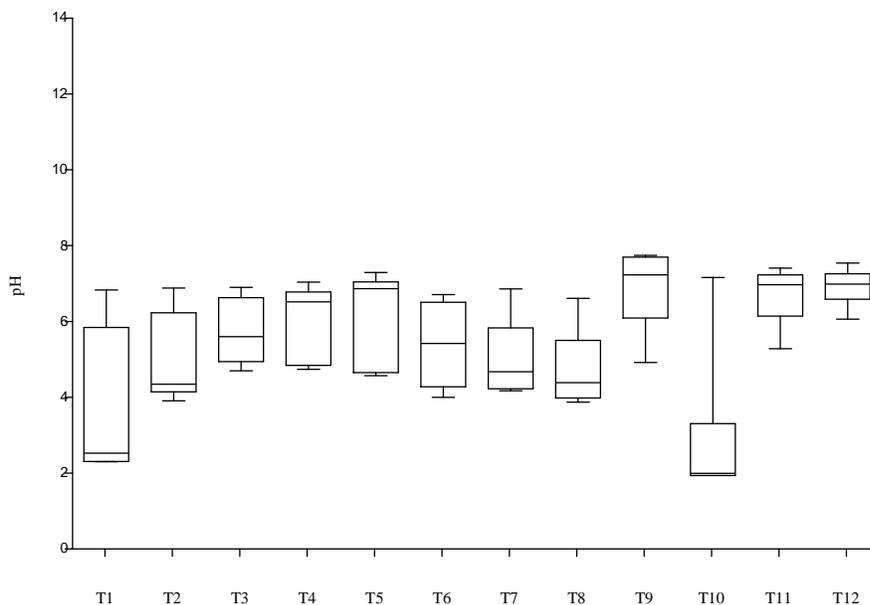
Figura 45 – Diagrama de Pareto do efeito padronizado em termos de degradação de MP.



Fonte: Autora, 2016.

O pH médio afluente do reator utilizado para o tratamento de MP foi de  $6,8 \pm 0,19$ . Na Figura 46 é possível observar acidificação do meio nos testes T1, T2, T6, T7, T8 e T10, onde as condições foram de 2,75 e  $5 \text{ g L}^{-1}$  de glicose no meio.

Figura 46 – Variação do pH no reator com MP, com biomassa imobilizada ao longo do planejamento experimental.



Fonte: Autora, 2016.

Apenas o teste T2 tinha uma baixa quantidade de glicose ( $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e foi acidificado também, o que pode ser atribuído ao consumo do MP.

#### 4.6 Etapa VII - Teste biológico

A contagem de Unidades Formadoras de Colônias - UFC, realizada com os efluentes dos reatores utilizados durante o planejamento experimental, indicou prevalência dos fungos em quase todas as 12 condições propostas pelo planejamento, sendo exceção a condição de 5 g L<sup>-1</sup> de glicose + 5 mg L<sup>-1</sup> de atrazina, conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16 – Teste biológico realizado no reator com ATZ no planejamento fatorial – contagem de bactérias e fungos.

| Condição   | Bactéria             | Fungo                 |
|--|----------------------|-----------------------|
| 0,5 g L <sup>-1</sup> glicose + 5 mg L <sup>-1</sup> pesticida     | 1,5*10 <sup>4</sup>  | 22,75*10 <sup>4</sup> |
| 0,5 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida  | 1,5*10 <sup>4</sup>  | 33*10 <sup>4</sup>    |
| 0,5 g L <sup>-1</sup> glicose + 30 mg L <sup>-1</sup> pesticida    | 5,7*10 <sup>4</sup>  | 79*10 <sup>4</sup>    |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 5 mg L <sup>-1</sup> pesticida    | 6,2*10 <sup>4</sup>  | 1150*10 <sup>4</sup>  |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida | 3,25*10 <sup>4</sup> | 66,5*10 <sup>4</sup>  |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida | 1,2*10 <sup>4</sup>  | 15*10 <sup>4</sup>    |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida | 104*10 <sup>4</sup>  | 210*10 <sup>4</sup>   |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida | 65*10 <sup>4</sup>   | 245*10 <sup>4</sup>   |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 30 mg L <sup>-1</sup> pesticida   | 67*10 <sup>4</sup>   | 290*10 <sup>4</sup>   |
| 5 g L <sup>-1</sup> glicose + 5 mg L <sup>-1</sup> pesticida       | 36*10 <sup>4</sup>   | 29,5*10 <sup>4</sup>  |
| 5 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida    | 25*10 <sup>4</sup>   | 32*10 <sup>4</sup>    |
| 5 g L <sup>-1</sup> glicose + 30 mg L <sup>-1</sup> pesticida      | 2,75*10 <sup>4</sup> | 4,2*10 <sup>4</sup>   |

Fonte: Autora, 2016.

Observou-se presença de bactérias em todas as condições de contagem; embora em menor quantidade, elas participaram do tratamento em batelada sequencial. As bactérias presentes nos dois reatores podem ter sido advindas da água de abastecimento utilizada para confecção do efluente sintético, e não foram consideradas prejudiciais ao desempenho dos reatores, visto que não se objetivou condição asséptica.

No reator com atrazina o aumento de glicose no meio proporcionou maior número de bactérias no efluente, chegando a ultrapassar a quantidade de fungos em apenas uma condição (5 g L<sup>-1</sup> de glicose + 5 mg L<sup>-1</sup> de atrazina), sendo o número de colônias de bactérias de 36.10<sup>4</sup> e 29,5.10<sup>4</sup> UFC, respectivamente para bactérias e fungos. Na mesma condição, observou-se proximidade entre a concentração de fungos e bactérias nas condições de 5 g L<sup>-1</sup> com 17,5 mg L<sup>-1</sup> e 30 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente 25.10<sup>4</sup> e 32.10<sup>4</sup>, e 2,75.10<sup>4</sup> e 4,2.10<sup>4</sup> UFC. Esse comportamento pode indicar que em maiores concentrações de glicose, outros micro-organismos podem aparecer em maior concentração.

Com relação ao reator que tratou água dopada com metil paration, em nenhuma condição estudada a concentração dos fungos foi ultrapassada pela de bactérias, conforme Tabela 17.

É necessário ressaltar que a presença de bactérias também foi verificada nesse reator, e assim como para o reator com atrazina, elas podem ser oriundas da água utilizada para o preparo do efluente sintético.

Tabela 17 – Teste biológico realizado no reator com MP no planejamento fatorial para contagem de bactérias e fungos.

| Condição   | Bactéria             | Fungo                |
|--|----------------------|----------------------|
| 0,5 g L <sup>-1</sup> glicose + 5 mg L <sup>-1</sup> pesticida     | 88,5*10 <sup>4</sup> | 900*10 <sup>4</sup>  |
| 0,5 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida  | 225*10 <sup>4</sup>  | 240*10 <sup>4</sup>  |
| 0,5 g L <sup>-1</sup> glicose + 30 mg L <sup>-1</sup> pesticida    | 175*10 <sup>4</sup>  | 370*10 <sup>4</sup>  |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 5 mg L <sup>-1</sup> pesticida    | 6,5*10 <sup>4</sup>  | 790*10 <sup>4</sup>  |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida | 65,5*10 <sup>4</sup> | 332*10 <sup>4</sup>  |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida | 155*10 <sup>4</sup>  | 530*10 <sup>4</sup>  |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida | 1,75*10 <sup>4</sup> | 36,5*10 <sup>4</sup> |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida | 21,5*10 <sup>4</sup> | 56*10 <sup>4</sup>   |
| 2,75 g L <sup>-1</sup> glicose + 30 mg L <sup>-1</sup> pesticida   | 58,5*10 <sup>4</sup> | 425*10 <sup>4</sup>  |
| 5 g L <sup>-1</sup> glicose + 5 mg L <sup>-1</sup> pesticida       | 150*10 <sup>4</sup>  | 330*10 <sup>4</sup>  |
| 5 g L <sup>-1</sup> glicose + 17,5 mg L <sup>-1</sup> pesticida    | 64*10 <sup>4</sup>   | 150*10 <sup>4</sup>  |
| 5 g L <sup>-1</sup> glicose + 30 mg L <sup>-1</sup> pesticida      | 1,9*10 <sup>4</sup>  | 2,5*10 <sup>4</sup>  |

Fonte: Autora, 2016.

#### 4.7 Etapa VIII - Teste de toxicidade com efluente final

Ao final do planejamento experimental (Teste 12), o efluente dos reatores foi submetido ao contato com as raízes de cebolas - *Allium cepa* L., para que se pudesse observar o grau de toxicidade/fitotoxicidade do mesmo. Na Tabela 18, pode-se constatar que o tratamento biológico conferiu polimento à água dopada com ATZ e MP, visto que o crescimento das raízes não foi verificado na caracterização que continha ATZ e na que continha MP o crescimento foi de apenas 0,25 cm.

Com o tratamento, após 7 dias de contato do efluente com os micro-organismos, as raízes expostas ao efluente cresceram  $1,25 \pm 0,35$  cm na amostra que continha o efluente com ATZ e  $2,2 \pm 0,42$  cm com o efluente oriundo do reator que tratou o metil paration.

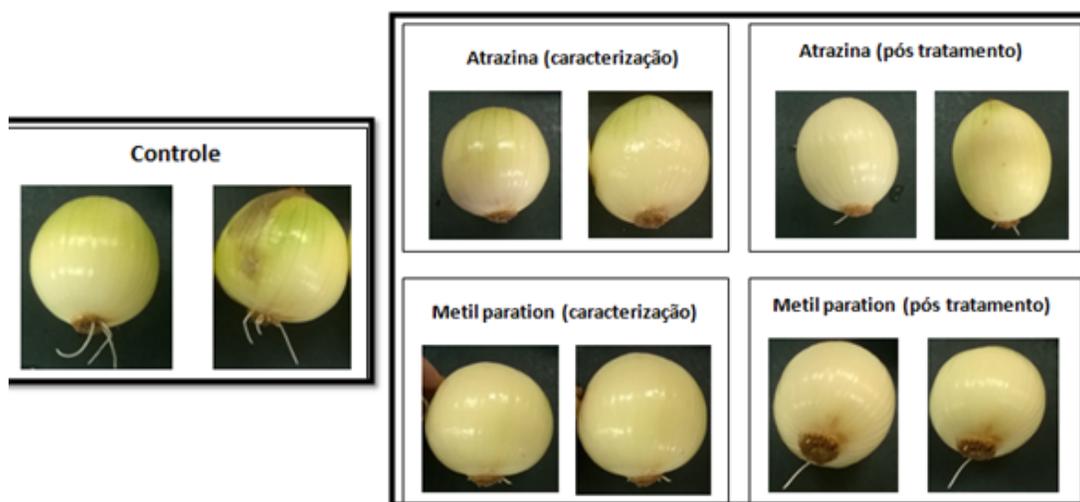
Tabela 18 – Crescimento das raízes das cebolas utilizadas para o teste de toxicidade com o efluente dos reatores e com o branco (água de abastecimento).

| Amostra            | Crescimento médio (cm) | Inibição de crescimento (%) |
|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| Branco             | 2,8 ± 0,2              | 0                           |
| Caracterização ATZ | 0,0                    | 100                         |
| Caracterização MP  | 0,25 ± 0,35            | 91                          |
| ATZ 7 dia          | 1,25 ± 0,35            | 55                          |
| MP 7 dia           | 2,2 ± 0,42             | 21,5                        |

Fonte: Autora, 2016.

Bolle *et al.* (2004) analisaram a capacidade da atrazina em promover clastogenicidade na espécie *Allium cepa* em ensaio utilizando as concentrações de 1 a 5 µg L<sup>-1</sup> de atrazina no meio líquido. Observou-se que a concentração de 5 µg L<sup>-1</sup> promoveu a quebra dos cromossomos da cebola, o que pode provocar mutações na espécie. O resultado encontrado pelos autores confirma o potencial xenobiótico da ATZ. No presente estudo pode-se verificar que nas cebolas colocadas em contato com a caracterização não houve crescimento das raízes das cebolas, como apresentado na Figura 47.

Figura 47 – Teste de toxicidade com cebolas para os reatores com atrazina e metil paration.



Fonte: Autora, 2016.

Torres (2012), objetivando aplicação de esgoto na agricultura, também avaliou a toxicidade de efluente sanitário tratado por processos biológicos. Foi observado 68% de

inibição de crescimento radicular com o efluente bruto, e depois do tratamento anaeróbio registrou-se apenas 40%, sendo então o tratamento considerado eficiente pelo autor.

No presente trabalho, o efluente do reator com atrazina obteve 55% de inibição de crescimento, e se comparado ao de Torres (2012), condição em que o esgoto foi doméstico, o tratamento com fungos pode apresentar vantagem, visto que o herbicida é considerado xenobiótico, e esgoto doméstico não.

Andrade (2012) investigou a eficiência de tratamentos físico-químicos, radiação UV e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para remoção de metil paration (30 mg L<sup>-1</sup>) presente em efluente sintético através de teste de genotoxicidade com *Allium cepa*. A autora conseguiu percentuais de remoção de 83 e 99% para radiação UV e processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, no entanto, no que se refere ao teste de exposição das cebolas ao efluente depois do tratamento, foi observado aumento na genotoxicidade do efluente, o que culminou também no não crescimento das raízes das cebolas. Já no presente trabalho observou-se melhoria do efluente depois do tratamento, indicando que o uso da espécie fúngica pode ser uma alternativa para o tratamento do metil paration.

Silva (2008), analisando a qualidade de águas do rio Criciúma, observou que no ponto que houve lançamento de esgoto industrial *in natura*, o crescimento das raízes das cebolas teve inibição de 68,07% quando comparado com água natural. O autor justificou o elevado percentual de inibição com a recalcitrância dos esgotos industriais. No presente estudo, a inibição do crescimento na caracterização da atrazina e do metil paration confirmaram a hipótese de recalcitrância destes pesticidas, e indicam que o tratamento biológico pode ser uma alternativa considerada.

#### **4.8 Etapa IX - Teste de saturação na biomassa e no meio suporte**

Para cada grama de espuma de poliuretano foram adsorvidos 17,6 mg de ATZ, como indicado na Tabela 19. Como nos reatores havia 15 g de meio suporte, a massa de ATZ que ficou adsorvida foi de 265,2 mg de pesticida. A quantidade adicionada de ATZ durante o período de operação do reator em bateladas sequenciais foi de 453,5 mg, assim, 30,23 mg de ATZ por grama de espuma foi a relação encontrada no reator, e foi superior à capacidade de saturação do meio suporte, indicando que os fungos foram capazes de degradar a ATZ.

Tabela 19 – Saturação da ATZ na espuma de poliuretano.

| <b>Tempo (min)</b> | <b>Co (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Ce (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Co-Ce (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Co-Ce x V (mg)</b> |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 0                  | 30,5                          | 0                             | 0                                | 0                     |
| 10                 | 30,5                          | 24,2                          | 6,3                              | 25,2                  |
| 20                 | 30,5                          | 16,9                          | 13,6                             | 54,4                  |
| 30                 | 30,5                          | 9,6                           | 20,9                             | 83,6                  |
| 40                 | 30,5                          | 5,1                           | 25,4                             | 101,6                 |
| 50                 | 30,5                          | 30,4                          | 0,1                              | 0,4                   |
| 60                 | 30,5                          | 30,5                          | 0                                | 0                     |
| $\Sigma$           |                               |                               |                                  | 265,2                 |

Co: Concentração inicial de ATZ; Ce: Concentração do efluente no tempo. Fonte: Autora, 2016.

Para o reator com MP, observou-se menor adsorção na espuma, sendo que para cada grama foram adsorvidos 13,4 mg de MP. A massa total de pesticida adsorvida no reator foi de 200,4 mg. Durante o experimento, foram colocados 449 mg de MP no reator, percebendo-se uma relação de 29,93 mg de MP por grama de meio suporte, também superior à capacidade de saturação da espuma utilizada.

Tabela 20 – Saturação do MP na espuma de poliuretano.

| <b>Tempo (min)</b> | <b>Co (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Ce (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Co-Ce (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Co-Ce x V (mg)</b> |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 0                  | 28,4                          | 0                             | 0                                | 0                     |
| 10                 | 28,4                          | 19,2                          | 9,2                              | 36,8                  |
| 20                 | 28,4                          | 11,4                          | 17                               | 68                    |
| 30                 | 28,4                          | 4,6                           | 23,8                             | 95,2                  |
| 40                 | 28,4                          | 28,3                          | 0,1                              | 0,4                   |
| 50                 | 28,4                          | 28,4                          | 0                                | 0                     |
| $\Sigma$           |                               |                               |                                  | 200,4                 |

Co: Concentração inicial de MP; Ce: Concentração do efluente no tempo. Fonte: Autora, 2016.

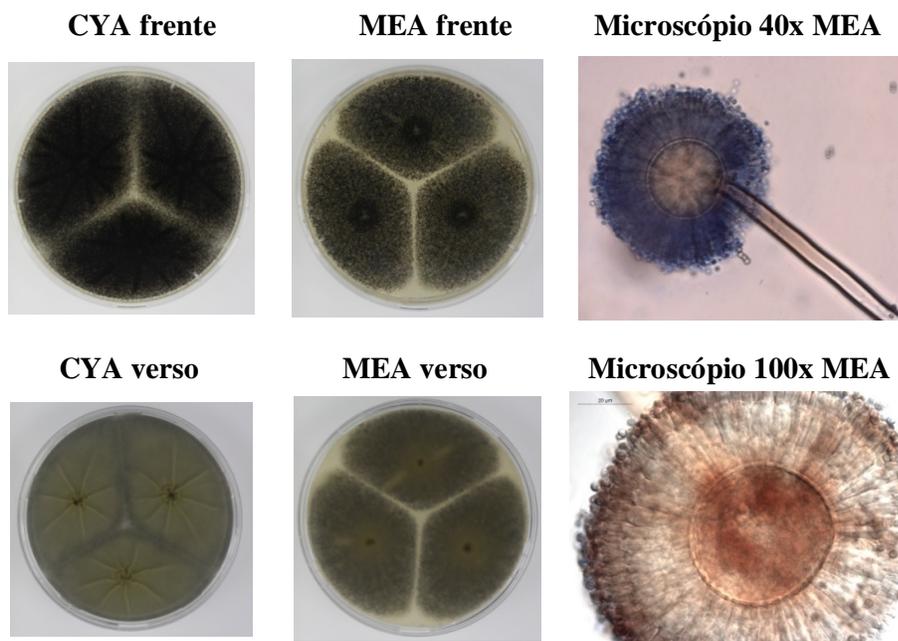
Sobre o teste de saturação na biomassa, observou-se que foram adsorvidos 1,05 mg de ATZ por grama de biomassa e 0,43 mg de MP para cada grama de biomassa. O reator com ATZ tinha 8,3 g de biomassa, enquanto que o reator com MP apresentou 14,6 g, assim a adsorção para o reator com ATZ foi de 8,7 mg e 6,6 mg de MP para o reator com MP. Os valores de adsorção na biomassa indicaram remoção via adsorção micelial de 1,9% de ATZ e 1,5% de MP, valores baixos em comparação com as remoções biológicas.

#### 4.9 Etapa X - Identificação, caracterização morfológica e molecular

Na Figura 48 está apresentada a identificação morfológica macroscópica e microscópica da espécie fúngica usada no estudo, crescida em meio MEA e CYA.

De acordo com Prakash e Jha (2014), a visualização morfológica da espécie *A.niger* em crescimento em placas indica que a superfície possui coloração preta e seu reverso deve possuir cor de branca a amarelada, sendo observada no presente estudo a coloração amarelada (quando exposto em meio CYA e em MEA).

Figura 48 - Identificação morfológica macroscópica e microscópica da espécie predominante nas amostras.



Fonte: Autora, 2016.

Característica típica do gênero *Aspergillus* é a vesícula em forma esférica, sub-esférica ou elíptica. Na Figura 49 é possível visualizar que a vesícula é sub-esférica, as células conidiógenas são biseriadas, metulas cobrem toda a superfície da vesícula e são maiores que as fiálides, condizentes com a morfologia descrita de *Aspergillus niger* (HOUBRAKEN *et al.*, 2014).

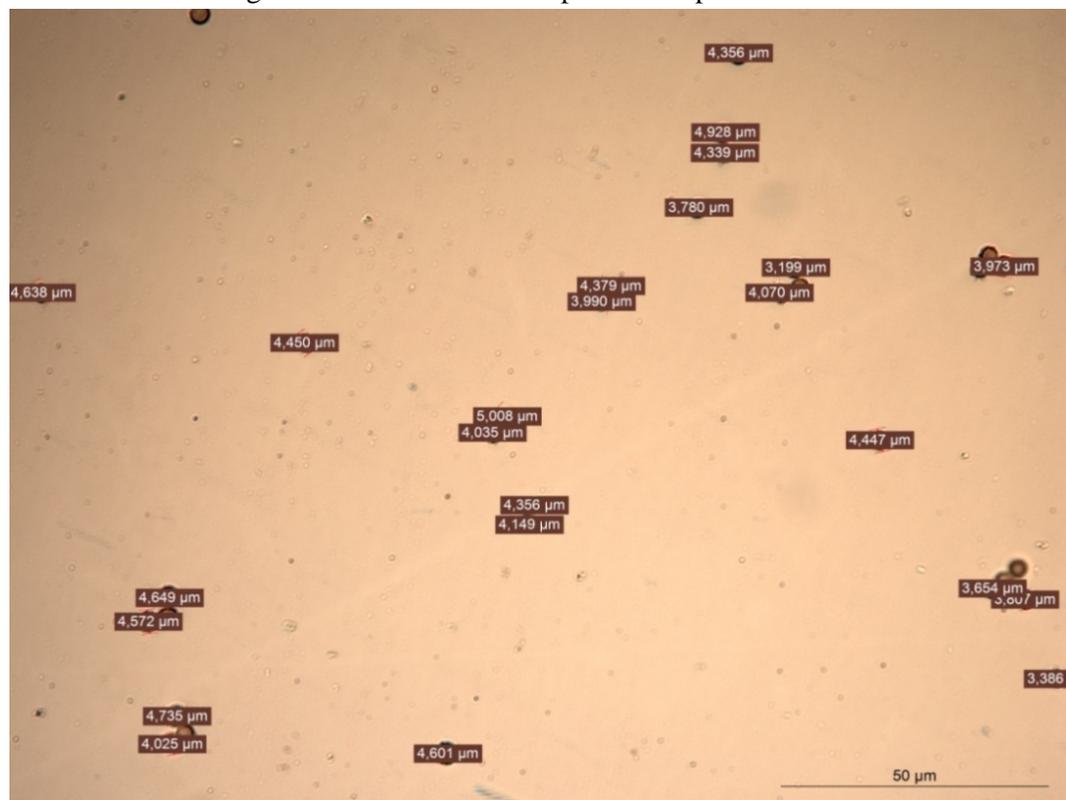
Figura 49 – Estrutura apresentando a vesícula, fiáldes e conídios da espécie isolada em aumento de 400 vezes.



Fonte: Autora, 2016.

O tamanho dos esporos foi medido por ferramenta disponível no microscópio óptico e observou-se que a média dos esporos da espécie isolada foi de 4,41 µm, conforme pode ser observado na Figura 50. No gênero *Aspergillus*, os esporos são produzidos por hifas vegetativas, e não são ramificados, terminando na vesícula, conforme indicou Prakash e Jha (2014).

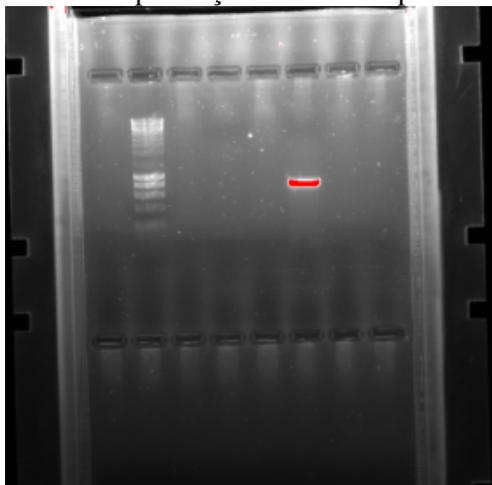
Figura 50 – Tamanho dos esporos da espécie isolada.



Fonte: Autora, 2016.

Para biologia molecular utilizou-se inicialmente a técnica de amplificação do DNA, sendo realizada com êxito como apresentada na Figura 51, com a banda em evidência na eletroforese em gel.

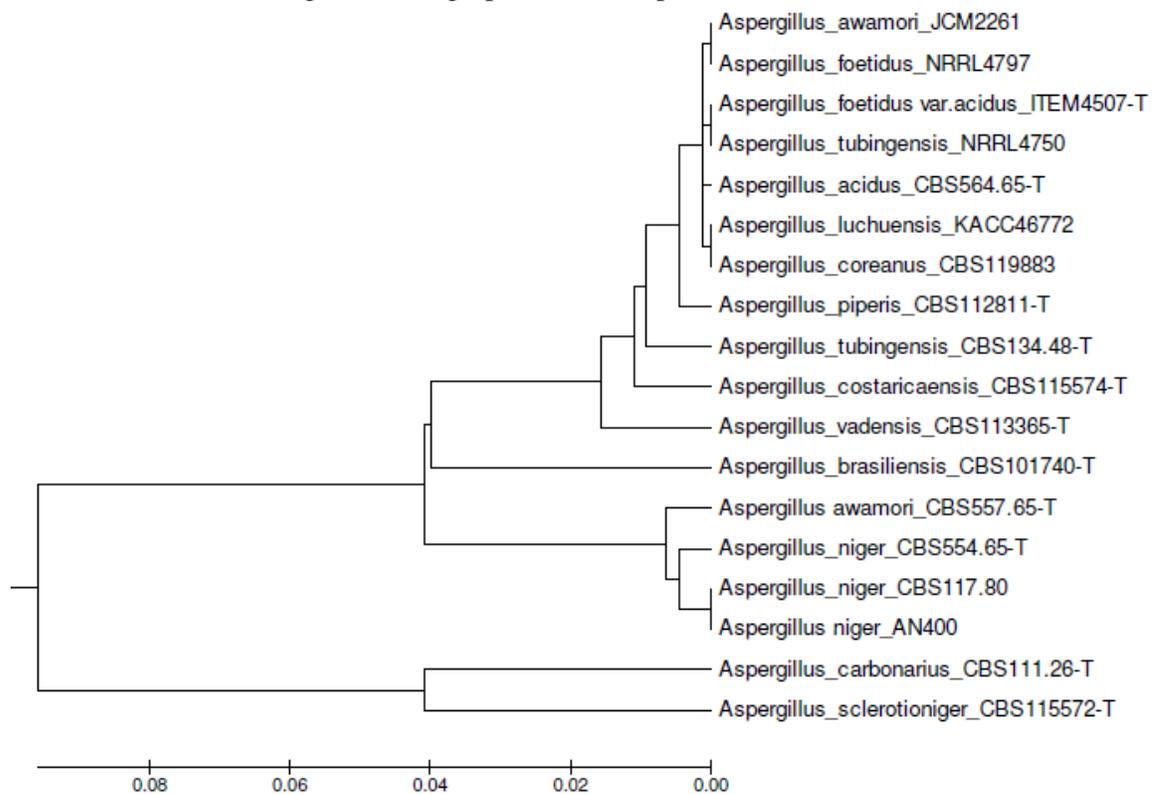
Figura 51 – Amplificação do DNA depois da PCR.



Fonte: Autora, 2016.

Depois de amplificação, o sequenciamento foi realizado e as sequências de nucleotídeos foram comparadas com as sequências depositadas no GenBank Nucleotide Database usando o programa de pesquisa BLAST. A comparação alocou a espécie isolada como *Aspergillus niger* AN 400, e a partir das sequências da espécie, pode-se criar a árvore filogenética apresentada na Figura 52, na qual se observou com clareza a aglutinação da espécie encontrada na seção *nigri*.

Figura 52 – Agrupamento da espécie encontrada.



Fonte: Autora, 2016.

## 5 CONCLUSÕES

A espécie *Aspergillus niger* AN 400 foi capaz de crescer em todas as concentrações usadas no teste de toxicidade dos pesticidas metil paration e atrazina, tendo sido observado crescimento menor nas placas com 40 mg L<sup>-1</sup> de ATZ e nas placas com 40 e 50 mg L<sup>-1</sup> de MP ;

O aumento na velocidade rotacional de 80 para 150 rpm proporcionou alcance de maiores percentuais de remoção de ATZ e MP, em todas as fases do estudo;

O uso de metanol como cossubstrato não possibilitou melhoria no desempenho do *Aspergillus niger* AN 400, possivelmente por sua elevada carga orgânica;

A adição de glicose como cossubstrato para degradação de metil paration e de atrazina com biomassa dispersa de *Aspergillus niger* AN 400 em batelada aerada proporcionou as melhores remoções com 3 g L<sup>-1</sup> de glicose para os reatores com ATZ e MP sem presença de metanol, e para os reatores com metanol e MP. Para os reatores com metanol, a melhor concentração de glicose para diminuição da ATZ foi de 2 g L<sup>-1</sup> de glicose ;

A realização das bateladas sequenciais com biomassa imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400 proporcionou melhoria no desempenho da degradação de MP, no entanto, não foi favorável para remoção de ATZ;

A glicose nas concentrações de 0,5 g L<sup>-1</sup> e 1 g L<sup>-1</sup> não influenciou positivamente na degradação de atrazina e metil paration em bateladas sequenciais com biomassa imobilizada. A concentração de 2 g L<sup>-1</sup> de glicose, no RBS com ATZ influenciou negativamente na remoção do pesticida;

O planejamento experimental indicou que o principal fator de interferência no reator com ATZ foi a concentração do herbicida, visto que quanto maior sua concentração no meio, menores as remoções obtidas. Para o MP observou-se que o *Aspergillus niger* foi capaz de se adaptar a todas as variações de condições do planejamento, e de remover o MP do meio;

O teste biológico realizado com os reatores utilizados no planejamento experimental indicou prevalência dos fungos em detrimento das bactérias ao longo da operação dos reatores. Observou-se que a maior concentração de pesticidas possibilitou maior concentração de fungos, enquanto que o aumento de glicose no meio favoreceu o crescimento de bactérias;

O teste de toxicidade com cebolas com o efluente dos reatores usados no planejamento experimental indicou diminuição da toxicidade dos efluentes com ATZ e MP, indicando que o tratamento realizado foi positivo para possível diminuição do impacto desses poluentes no ambiente;

A identificação genética da espécie fúngica utilizada no estudo indicou a presença da espécie *Aspergillus niger*.

O uso da espécie *Aspergillus niger* AN 400 apresentou-se como uma alternativa para o tratamento de águas contaminadas com atrazina e metil paration. Observou-se que o uso do metanol pode interferir negativamente no processo e que a imobilização da biomassa não trouxe melhoria nos percentuais de remoção de atrazina.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, sugere-se:

- Realizar estudos com atrazina em variadas concentrações em reatores com biomassa dispersa e imobilizada;
- Avaliar a produção de enzimas fúngicas, como lacase e manganês peroxidase;
- Identificar os subprodutos da degradação de ATZ e MP;
- Realizar bateladas com tempo de reação de 30 dias com atrazina;
- Verificar o desempenho de reatores com ATZ e MP utilizando etanol como cossustrato;
- Utilizar efluente *in natura* de indústria de fabricação de pesticidas em reatores inoculados com *Aspergillus niger*;
- Avaliar a eficiência de remoção de metil paration em reator de fluxo contínuo;
- Utilizar variadas concentrações de glicose em batelada agitada com 80 e 150 rpm para verificar a influência de cossustrato de fácil degradação na remoção de ATZ e MP.

## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P.C.; SINGH, Nandita. Pesticide use and application: An Indian scenario. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 165, n. 1-3, p.1-12, 15 jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.061>.
- ANDRADE, Barbara Rodrigues Geraldino de. **Estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de *Allium cepa* da parationa metilica antes e após aplicação dos processos UV e UV/H2O2**. 2012. 194 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- ANDRADE, Marcus Vinicius Freire et al. Azo dye degradation by *Phanerochaete chrysosporium* in the medium enriched with nitrogen in the presence of primary co-substrate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 56, n. 5, p.867-874, out. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132013000500019>.
- APHA- ASSOCIATION, American Public Health. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington: American Health Association, 2005.
- ARAÚJO, Kênia Cristina Nassif de. **Degradação de hidrocarbonetos por fungos filamentosos**. 2010. 62f. Monografia (Especialização) –Curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- ARMAS, Eduardo Dutra de et al. Uso de Agrotóxicos em Cana-de-açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o Risco de Poluição Hídrica. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 6, p. 975-982,dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000600008>.
- BARBOSA, Daniela Bueno Piaz. **Degradação de atrazina em solo sob plantio direto aplicado em formulações de liberação controlada**. 2013. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em ciências do solo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- BARKER, James. et al. The influence of methanol in gasoline fuels on the formation of dissolved plumes, and the fate and natural remediation of methanol and BTEX dissolved in groundwater. 1992. In P. T. Kostecki & E. J. Calabrese (Eds.), Hydrocarbon contaminated soils and groundwater, p. 264-273. New York: Lewis Publishers.
- BARR, Dana B. et al. Measurement of p-Nitrophenol in the Urine of Residents Whose Homes Were Contaminated with Methyl Parathion. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 110, n. 6, p.1085-1091, 1 dez. 2002. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.02110s61085>.
- BARROSO, Cinthya Babá. **Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus niger***. 2006. 111 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio Ventura -UNESP, São Paulo -SP, 2006.

BEDOR, Cheila Nataly Galindo. **Estudo do potencial carcinogênico dos agrotóxicos empregados na Fruticultura e sua implicação para a vigilância da saúde.**2008. 115 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Recife –PE, 2008.

BESSAC, Fabienne; HOYAU, Sophie. Pesticide interaction with environmentally important cations: A theoretical study of atrazine. **Computational And Theoretical Chemistry**, [s.l.], v. 966, n. 1-3, p.284-298, jun. 2011. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.comptc.2011.03.024>.

BETTIN, Fernanda. **Cinética de Crescimento e Produção de Lacases do Fungo Pleurotus Sajor-Caju PS- 2001(Fr.) Singer em Processo Submerso em Biorreator com Agitação Mecânica.**2010. 230 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul –RS, 2010.

BOLLE, Paola et al. Clastogenicity of atrazine assessed with theAllium cepa test. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [s.l.], v. 43, n. 2, p.137-141, 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/em.20007>.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 jul. 1989. Disponível em:  
[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm) . Acesso em 28/12/2016.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em:  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 24/07/2015.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 410. Prorroga o prazo para complementação das condições e padrões de lançamento de efluentes, previsto no art. 44 da Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, e no art. 3º da Resolução nº 397, de 3 de abril de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 maio de 2009. Disponível em:  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=603> Acesso em: 24/07/2015.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 maio. 2011. Disponível em:  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646> Acesso em: 24/07/2015.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado Federal: Centro Gráfico, 1988.

CARNEIRO, Fernando Ferreira et al. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde**. Rio de Janeiro: World Nutrition, 2015. 628 p.

CEARÁ. Superintendência Estadual do Ceará. Portaria n° 154. Dispõe sobre padrões e condições para lançamento de efluentes líquidos gerados por fontes poluidoras. **Diário Oficial do Estado**, Ceará, 01 out. 2002.

Disponível em:

[http://antigo.semace.ce.gov.br/integracao/biblioteca/legislacao/conteudo\\_legislacao.asp?cd=95](http://antigo.semace.ce.gov.br/integracao/biblioteca/legislacao/conteudo_legislacao.asp?cd=95) Acesso em: 29/08/2016

CHEN, Shaohua et al. Biodegradation of Chlorpyrifos and Its Hydrolysis Product 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol by a New Fungal Strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.1-12, 8 out. 2012. Public Library of Science (PLoS).

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047205>

CHU, Khim Hoong; FENG, Xiao; YUAN, Gang. Application of Dual Media Biofilm Reactors for Removing Organic Matter and Ammonia from Pesticide Wastewaters. **Journal Of Advanced Chemical Engineering**, [s.l.], v. 1, p.1-6, 2011. OMICS Publishing Group.

<http://dx.doi.org/10.4303/jace/a110103>

COELHO, Edumar Ramos Cabral; DI BERNARDO, Luis. Remoção de atrazina e metabólitos pela filtração lenta com leito de areia e carvão ativado granular. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [s.l.], v.17, n.3, p. 269-276, 2012.

COSTA, Andréa Fernanda de Santana. **Aplicação de tratamentos biológicos e físico-químicos em efluentes de lavanderia e tinturaria industriais no município de Toritama no Estado de Pernambuco**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife –PE, 2008.

DUWE, Rodrigo. **Estudo da degradação de efluente KRAFT por basidiomicetos**. 2013. 72 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2013.

FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Influence of pectin, glucose, and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. **Brazilian Journal Chemical Engineering**, [s.l.], v.29, n. 4, p. 683-690, 2012.

FRANCO, Caroline da Rocha. **A formulação da política de agrotóxicos no Brasil**. 2014. 211 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Políticas Públicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2014.

GETENGA, Z. M.; DOERFLER, U.; SCHROLL, R. Study of atrazine degradation in soil from Kenyan sugarcane-cultivated fields in controlled laboratory conditions. **Toxicological & Environmental Chemistry**, [s.l.], v.91, n.2, p. 195–207, 2009. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.1080/02772240802144497>.

GORZA, Nadja Lima. **Remoção de agrotóxicos em uma instalação piloto de tratamento de águas de abastecimento do tipo convencional, associado à pré-oxidação e adsorção em carvão ativado granular.** 2012. 134 f. Dissertação ( Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória – ES, 2012.

HAI, Faisal I. et al. Pesticide removal by a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s.l], v. 43, p. 459–462, 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2011.11.002>.

HATAMI, Masoud ; YOUNESI, Habibollah ; BAHRAMIFAR, Nader. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of rice cooker wastewater by using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. **Journal of Applied Research in Water and Wastewater**, [s.l], v.2, n.1, p.103-107, 2015.

HAYES, W. J.; LAWS, E. R. **Handbook of pesticides toxicology.** 1º ed. Academic Press, San Diego, 1997.

HENN, Carolina. **Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diurom – produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos.** 2009. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo – SP, 2009.

HOUBRAKEN, J.; VRIES, R. P.; SAMSON, R. A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, [s.l], v. 86, p. 199-249, 2014.

KALINKE, Cristiane; BETIOLO, Diego Maurício. **Degradação de atrazina proveniente de laboratório de análises cromatográficas utilizando os processos fenton e foto-fenton.** 2011. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Bacharelado em Química Industrial), Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Pato Branco – PR, 2011.

KHINDARIA, A.; GROVER, T. A.; AUST, S.D. Reductive dehalogenation of aliphatic halocarbons by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Environmental Science Technology**, v. 29, p.719-725, 1975.

KIST, Cristina Patrícia. **Estudo da degradação de compostos nitroaromáticos usando fungos do gênero *Pleurotus*.** 2013. 115f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia, Centro Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná, Curitiba – PR, 2013.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus niger* species. **The Netherlands: Centraal bureal voor Schimmelcultures**, 116p., 2002.

KOLEKAR, P. D.; PHUGARE, S. S.; JADHAV, J. P. Biodegradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. BCH2 to *N*-isopropylammelide with subsequent assessment of toxicity of biodegraded metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l], v.21, n.3, p. 2334–2345, 2014.

KÖRBES, Daiane. et al. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico: revisão de literatura. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, [s.l.], v. 15, n.1, p. 146-52, 2010.

KRISTOFF, G. et al. Effects of the organophosphate insecticide azinphos-methyl on the reproduction and cholinesterase activity of *Biomphalaria glabrata*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 84, n.5, p. 585–591, 2011.

LATIFI, Ali Mohammad. et al. Isolation and characterization of five chlorpyrifos degrading bacteria. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 11, n.13, p. 3140-3146, 2012.

LEME, Paulo César. **Filmes de nanopartículas de dióxido de titânio com undecatungstostomanganês (melanina) e sua reatividade frente a atrazina**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo –SP, 2010.

LIMA, Andreza Maria de; AZEVEDO, Camila Firmino de. Impactos culturais e socioambientais deixados pela Revolução Verde na região do brejo paraibano – Brasil. **Revista Verde**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 116 - 123, (Edição Especial), 2013.

LONDRES, Flávia. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

LOPES, Maria Margareth Gonçalves. et al. Estudo da descoloração do corante FD&C azul no 2 Indigotina pelo tratamento combinado do fungo *Trametes versicolor* e processo de filtração lenta. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [s.l.], v.19, n.2, p. 113-120, 2014.

LOPES, Marina Santos da Silva. et al. Remoção de macronutrientes de efluente da indústria de castanha de caju por uso de reator aeróbio em batelada com inóculo fúngico. **Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental**, [s.l.], v.16, n. 1, p. 17-26, 2011.

LUCARINI, Adriana C.; SILVA, Leandro A. da; BIANCHI, Reinaldo A. C. Um sistema para a contagem semi-automática de microorganismos. **Revista Pesquisa & Tecnologia FEI**, [s.l.], n.26, p. 36 - 40, 2004.

LUNA, Marcos Aantônio Cavalcanti. **Efeitos do Cobre em *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1261: Aspectos morfológicos, ultraestruturais e bioquímicos**. 2013. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife – PE, 2013.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. Tradução: Andréa Queiroz Maranhão. Porto Alegre: Artmed, 2010.

**MANUAL DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE DE POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTOXICOS**. Brasília, Organização Pan-Americana da Saúde. Representação no Brasil, 1997.

MARCIAL, Jaime ; BARRIOS-GONZA'LEZ, Javier ; TOMASINI, Arceli. Effect of médium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid state culture. **Process Biochemistry**, [s.l], v. 41, n.2, p. 496-500, 2006.

MARTON, J; STERN, A. M; MARTON, T. Decolourization of kraft black liquor with *Polyporus versicolor*, a white-rot fungus. **Tappi Journal**,[s.l], v. 53, p. 1975–1981, 1969.

MATOS, Antônio da Silva. **Análise das intoxicações exógenas por agrotóxicos no Brasil, entre 2007 a 2012**. 2013. 50 f. Monografia (Bacharelado em Saúde Coletiva) - Universidade de Brasília, Brasília – DF, 50p., 2013.

MENDONÇA, Maria Clara Mavia. **Tratamento de água de produção em reator anaeróbio**. 2009. 155f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE, 2009.

MÉXICO. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo**. La experiencia en México. Patricia Ramírez Romero y Ania Mendoza Cantú (Compiladoras). DelegaciónTlalpan, México, D. F. 2008.

MORE, Tajani. et al. Potencial use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. **Bioresource Technology**,[s.l], v. 101, n.20, p. 7691-7700, 2010.

NOBLES, Mildred K. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomyces. **Canadian Journal of Botany**,[s.l], v. 43, n.9, p. 1097-1139, 1975.

OLIVEIRA, Noemi Pereira. et al. Malformações congênitas em municípios de grande utilização de agrotóxicos em Mato Grosso, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l], v.19, n.10, p.4123-4130, 2014.

OLIVEIRA, Tamiris Garbiatti de; FAVARETO, Ana Paula Alves; ANTUNES, Patrícia Alexandra. Agrotóxicos: levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos. **In: IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**,[s.l], v. 9, n. 11, p. 375-390, 2013.

OTTONI, Cristiane. **Descoloração de corantes têxteis por fungos ligninolíticos em condições de pH e salinidade elevada**. 2012. 176 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade do Minho, Braga – PT, 2012.

PAPAGIANNI, Maria. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**,[s.l], v. 25, n.3, p.244-263, 2007.

PARSHILOV, I. A; WOODLING, K.; SUTHERLAND, J. B. Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l], v.99, n.17, p. 6971-6986, 2015.

PAWLOWSKY, Urivald. et al. Tratabilidade de efluentes de produção de pesticidas. **In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Fóz do Iguaçú: ABES, p. 793-802, 1997.

PEREIRA, Patrícia Maia. **Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida atrazina**. 2011. 92f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro – RJ, 2011.

PETRONILHO, Elaine da C.; FIGUEROA-VILLAR, José Daniel. Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. **Revista Virtual Química**, [s.l.], v.6. n.3, p.671-686, 2014.

PIZATO, Everton. Avaliação **da capacidade de remoção de corante têxtil pelo fungo Lasiodiplodia theobromae MMPI em efluente sintético e industrial**. 2013. 101f. Dissertação ( Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de processos químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco – PR, 2013.

PRAKASH, R.; JHA, S. N. Basics of the Genus *Aspergillus*. **International Journal of Research in Botany**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 26-30, 2014.

PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. et al. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialaophora* sp, strain T1. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.

RAIMBAULT, M. General and microbial aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, 1998.

RAMADEVI, Chalamala; NATH, Mitta Mahendra; PRASAD, Muppala Guru. Mycodegradation of malation by soil fungal isolate *Aspergillus niger*. **International Journal of basic and applied chemical sciences**, [s.l.], v. 2, p. 2073-2277, 2012.

REBELO, Rafaela Maciel; CALDAS, Eloisa Dutra. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova**, [s.l.], v.37, n.7, p.1199-1208, 2014.

REINEHR, Christian Oliveira. et al. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, [s.l.], v.37, n.3, p. 454-460, 2014.

RODRIGUES, Gisele Nunes. **Biotransformação do pesticida metil paration por fungos isolados da ascidia *Didemnum ligulum***. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em ecologia e recursos naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2013.

RODRIGUES, Kelly de Araújo. et al. Influência da glicose e da concentração do inóculo fúngico no tratamento de efluente da castanha de caju. **Revista Conexões – Ciência e tecnologia**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 41-51, 2010.

- RODRIGUEZ, Suzana Couto. Dye removal by immobilized fungi. **Biotechnology Advances**,[s.l], v. 27, n.3, p. 227-235, 2009.
- SALLES. C. M. C. de. et al. Avaliação do efeito do metil paration sobre as enzimas do metabolismo da serotonina em cérebro de pacu por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Analytica**,[s.l], v. 1, n.2, p. 49-58, 2002.
- SAMPAIO, Glória Maria Marinho Silva. **Remoção de Metil paration e Atrazina em reatores de bancada com fungos**. 2005. 113 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós- graduação em Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2005.
- SÁNCHEZ, S. R. et al. Removal of triazine herbicides from aqueous systems by a biofilm reactor continuously or intermittently operated. **Journal of Environmental Management**, [s.l], v.128, p. 421-426, 2013.
- SANTIAGO, Iara Furtado. **Bioprospecção de metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a angiospermas presentes na antártica**.2011. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto - MG, 2011.
- SARDROOD, Babak Pakdaman; GOLTAPEH, Ebrahim Mohammadi .; VARMA, Ajit. An Introduction to Bioremediation Fungi as Bioremediators. **Soil Biology, Springer**,[s.l], v. 32, p.3-27, 2014.
- SARI, Ajeng Arum; TACHIBANA, Santo; ITOH, Muryanto. Correlation of Ligninolytic Enzymes from the Newly-Found Species *Trametes versicolor* U97 with RBBR Decolorization and DDT Degradation. **Water, Air, & Soil Pollution**,[s.l], v.223, n.9, p. 5781-5792, 2012.
- SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Revista Biológico**,[s.l] v.73, n.1, p.91-92, 2011.
- SEADE. Anuário Estatístico do Estado de São Paulo: Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br/produtos/anuario/>>. Acesso em: 20 set. 2014.
- SENE, Luciane. et al. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology na International Journal**, [s.l], v.53, n.2, p. 487-496, 2010.
- SHARMA, Neha; GUPTA, Vikas C. Comparative Biodegradation Analysis of Phenol from Paper & Pulp Industrial Effluent by Free and Immobilized Cells of *Aspergillus Niger*. In: **International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE**, v.30. Meerut, 2012.
- SILVA, Gustavo Bianc; BOTELHO, Maria Isabel Vieira. O processo histórico da modernização da agricultura no Brasil (1960-1979). **Revista de geografia agrária**,[s.l], v. 9, n. 17, p. 362-387, 2014.

SILVA, Natália Alvarenga. **Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenós for fungos de origem marinha.** 2013. 161 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Ciências, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos – SP, 2013.

SILVA, Patrícia Schimitz. **Avaliação da toxicidade e genotoxicidade das águas do rio cricúma (SC) utilizando como organismos Bioindicadores *Artemia sp.*, *Daphnia magna* e *Allium cepa*.** 2008. 92 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade do Extremo Sul Catarinense, Cricúma –RS, 2008.

SINDAG - Sindicato Nacional da indústria de produtos para defesa agrícola. **Panorama de 2009.** Disponível em: <http://www.sindag.com.br>. Acesso em: 24/06/2014.

SINITOX: **Sistema Nacional De Informações Tóxico Farmacológicas, 2011.** <http://www.fiocruz.br/sinitox/media/agrotoxico%20agricola%20Tabela%201.pdf> .Acesso em: 07/10/2014.

SOARES, I. A. et al. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**,[s.l], v.78, n.2, p.341-350, 2011.

SOUZA NETO, Aristides. **Estudo da degradação de água residuária sintética dopada com os pesticidas atrazina, metil paration, paraquat e deltametrina em reatores em batelada inoculados com a espécie fúngica *Aspergillus niger* AN 400.** 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Fortaleza -CE, 2012.

SOUZA, Cristiano Costa de. **Estudo do desempenho de reatores de lodos ativados de fluxo contínuo e de batelada no tratamento de águas residuárias em regime não estacionário.** 2011. 126 f. Monografia (Escola de Engenharia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

STUANI, F. H. et al. Análise de parâmetros de processo relacionados ao crescimento de *Aspergillus oryzae* em biorreatores de agitação mecânica e *airlift*. **In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ**, Florianópolis –SC, p. 1-8, 2014.

TEBBOUCHE, Latifa. et al. Evaluation of the phenol biodegradation by *Aspergillus niger*: application of full factorial design methodology. **Desalination and Water Treatment**, [s.l], v. 57, n.13, p.1-7, 2015.

TORRES, Danila de Leone França e Freitas. **Avaliação da toxicidade de efluente sanitário tratado e condicionado para aplicação na agricultura, utilizando *Allium cepa*, *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*, como organismos-teste.** 2012. 154 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Unicamp, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2012.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C.L. **Microbiologia.** Porto Alegre: Artmed, 10 ed, 2012.

USHARANI, K.; MUTHUKUMAR, M. Optimization of aqueous methylparathion biodegradation by *Fusarium* sp in batch scale process using response surface methodology.

**International Journal of Environmental Science & Technology**, [s.l], v. 10, n.3, p. 591–606, 2013.

VANCONDIO, Bruna. **Biodegradação do pesticida pentaclorofenol por uma linhagem de fungo marinho isolado da ascídia *Didemnum ligulum***. 2014. 96 f. Dissertação ( Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2014.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. V. 1, 3ª. edição, DESA, Ed. UFMG, 2005.

VONBERG, David. et al. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. **Water research**, [s.l], v. 50, p. 294-306, 2014.

WEN, Jiwei. et al. Co-metabolic degradation of pyrene by indigenous white-rot fungus *Pseudo trametes gibbosa* from the northeast China. **International Biodeterioration and Biodegradation Journal**, [s.l], v. 65, n.4, p.600-604, 2011.

XIE, S. et al. Atrazine biodegradation by *Arthrobacter* strain DAT1: effect of glucose supplementation and change of the soil microbial community. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l], v. 20, p. 4078–4084, 2013.

ZANIN, Evandro. et al. Estudo da degradação de compostos fenólicos presente em águas residuárias de postos de combustíveis utilizando fungos filamentosos (*Aspergillus Flavus*). **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET**, [s.l], v. 18, n. 1, p.279-287, 2014.