



Campus de São Carlos

**REMOÇÃO DE METIL PARATION E ATRAZINA EM
REATORES DE BANCADA COM FUNGOS**

Glória Maria Marinho Silva Sampaio
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Tédde Santaella
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

GLÓRIA MARIA MARINHO SILVA SAMPAIO

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP
EXEMPLAR REVISADO
Data de entrada no Serviço... 27 / 10 / 05
Ass.:..... *lesar*

REMOÇÃO DE METIL PARATION E
ATRAZINA EM REATORES DE BANCADA
COM FUNGOS

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Hidráulica e Saneamento.



ORIENTADORA: Prof^a Dra. Sandra Tédde Santaella

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

São Carlos

2005

DEDALUS - Acervo - EESC



31100053588

Class.	TESE-EE50
Cutt.	5305
Tombo	T279/05
Sysno	1476550

s192r Sampaio, Glória Maria Marinho Silva.
Remoção de metil paration e atrazina em reatores de bancada com fungos / Glória Maria Marinho Silva Sampaio. -- São Carlos, 2005.

.Tese (Doutorado) - - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2005.
Área: Hidráulica e Saneamento.
Orientadora: Profª. Dra. Sanra Tédde Santaella.
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat.

1. *Aspergillus niger*. 2. Metil paration.
3. Atrazina. 4. Reatores biológicos. 5. Água.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Farmacêutica **GLÓRIA MARIA MARINHO SILVA SAMPAIO**

Tese defendida e julgada em 12-08-2005 perante a Comissão Julgadora:


Prof. Dra. **SANDRA TÉDDE SANTAELLA (Orientadora)**
(Universidade Federal do Ceará/UFC)

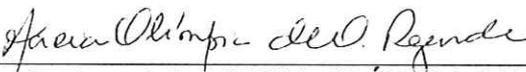
Aprovada


Prof. Associado **MARCELO ZAIAT**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

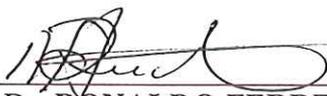
Aprovada


Prof. Titular **JOSÉ ROBERTO CAMPOS**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

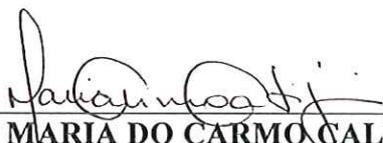
Aprovada


Prof. Associada **MARIA OLÍMPIA DE OLIVEIRA REZENDE**
(Instituto de Química de São Carlos/USP)

aprovada


Prof. Dr. **RONALDO FERREIRA DO NASCIMENTO**
(Universidade Federal do Ceará/UFC)

Aprovada


Prof. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento) e
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

Aos meus pais, José Cândido e Claudete, ao meu marido, Ronaldo e aos meus filhos Daniel e Guilherme, meus grandes e eternos amores.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, luz e inspiração.

Aos meus queridos pais José Cândido e Claudete, os grandes responsáveis por tudo que alcancei em minha vida, e à minha querida irmã Germana Marinho, grande amiga e companheira de todas as horas.

À professora Sandra Tédde Santaella, exemplo de dedicação e compromisso, pela orientação e ensinamento, pela bela amizade surgida, pela confiança, pelo seu profissionalismo e, principalmente, por estar presente em todos os momentos desta difícil e estimulante jornada.

Ao professor Marcelo Zaiat, pela orientação, ensinamentos e atenção sempre dispensados com muito humor e profissionalismo.

Ao Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará (CEFET) – UnED Juazeiro do Norte, pelo total apoio e liberação, inicialmente sob a direção do Prof. Mauro Oliveira e Profª. Ialuska Guerra e agora no final sob direção do Prof. Cláudio Ricardo.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – PROCAD), pela concessão da bolsa de estudos e parte do apoio financeiro à pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, por parte do financiamento da pesquisa.

Ao meu marido Ronaldo pelo apoio e amor incondicionais dedicados durante esta jornada.

Aos meus filhos Dan e Gui pela compreensão, carinho e amor.

À Bené pelo apoio, companheirismo e amizade verdadeira.

À Kelly Araújo Rodrigues, amiga de estudo e companheira de trabalho, com quem dividi momentos de alegria, de dúvidas, de certezas e de vitórias.

A todos os professores do Departamento de Hidráulica e Saneamento pela agradável convivência e, principalmente, pela contribuição à minha formação profissional.

Aos professores Maria do Carmo Calijuri, José Roberto Campos, Ronaldo Ferreira Nascimento, Maria Olímpia Oliveira Rezende, pelas sugestões recebidas durante as qualificações e por terem aceitado participar da banca de defesa.

Ao Prof. Everardo Albuquerque Menezes da Faculdade de Farmácia (UFC) pela identificação e produção dos fungos na fase inicial da pesquisa.

À Sá e Pavi pelo profissionalismo e gentilezas prestadas.

À Anaila Santos Souza por todas as orientações durante as análises cromatográficas.

Aos queridos amigos do LABOSAN, em especial, à Roseli, Isabelle, João Paulo, Rosinha, Mário, Paulinho, Carlinha, Emília e Jaci.

A todas as pessoas que de forma indireta colaboraram com este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	4
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1 PESTICIDAS – METIL PARATION E ATRAZINA	6
4.2 ESTUDOS SOBRE REMOÇÃO DE PESTICIDAS	11
4.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE FUNGOS	20
4.4 ESTUDOS SOBRE O PODER DE DEGRADAÇÃO DOS FUNGOS	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 FASE EM BATELADA COM METIL PARATION E MICÉLIO DE FUNGOS ..	38
5.1.1 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES FÚNGICAS	38
5.1.2 CULTIVO E PREPARO DAS ESPÉCIES FÚNGICAS	39
5.1.3 COMPOSIÇÃO DOS SUBSTRATOS	39
5.1.4 MONTAGEM DOS REATORES	40

5.2 CULTIVO, PRODUÇÃO E CONTAGEM DE ESPOROS DE <i>Aspergillus niger</i> (AN400)	42
5.3 TESTE DE TOXICIDADE EM PLACAS	43
5.4 FASE EM BATELADA COM METIL PARATION, ATRAZINA E ESPOROS DE <i>Aspergillus niger</i> AN400	43
5.4.1 SUBSTRATOS	44
5.4.2 MONTAGEM DOS REATORES EM BATELADA SOB AGITAÇÃO	44
5.4.3 AVALIAÇÃO CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO DE ATRAZINA E DE METIL PARATION	46
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	47
5.6 OPERAÇÃO EM REATOR DE LEITO FIXO E ESCOAMENTO ASCENDENTE PARA DEGRADAÇÃO DE METIL PARATION	48
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 OPERAÇÃO EM BATELADA COM METIL PARATION E MICÉLIO DE FUNGOS	51
6.2 OPERAÇÃO EM BATELADA COM METIL PARATION E ESPOROS DE <i>Aspergillus niger</i> (AN400)	60
6.3 OPERAÇÃO EM BATELADA COM ATRAZINA E ESPOROS DE <i>Aspergillus niger</i> AN400	66
6.4 OPERAÇÃO EM REATORES DE LEITO FIXO E ESCOAMENTO ASCENDENTE	70
6.4.1 PRIMEIRA FASE DE OPERAÇÃO COM TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA DE 12 h E 0,5 g GLICOSE/L	70
6.4.2 SEGUNDA FASE DE OPERAÇÃO APÓS PASSAGEM DO MEIO SABOURAUD COM TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA DE 12 h E 0,5 g GLICOSE/L	73

6.4.3 TERCEIRA FASE DE OPERAÇÃO COM TEMPO DE DETENÇÃO HIDRÁULICA DE 12 h E 1,0 g GLICOSE/L	76
7. CONCLUSÕES	81
8. RECOMENDAÇÕES	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

“A vida tem a cor que você pinta”

Anônimo

RESUMO

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

Neste estudo foi avaliada a remoção de metil paration - inseticida e atrazina - herbicida presentes em água, em reatores de bancada, com fungos. A pesquisa foi dividida em quatro etapas: operação em batelada com metil paration e micélio fúngico, com e sem glicose; teste de toxicidade em placas com *Aspergillus niger* AN400; operação em batelada com os pesticidas atrazina e metil paration e esporos de *Aspergillus niger* AN400, com e sem glicose; e operação em reatores de leito fixo e fluxo ascendente. Na primeira etapa, a remoção de metil paration foi de 97% nos reatores sem glicose e 94% nos reatores com glicose com 32 dias de reação. Na operação em batelada, com esporos, um modelo cinético de primeira ordem representou bem a velocidade de decaimento de metil paration nesta fase, principalmente, nos reatores que continham glicose. Para os experimentos sem adição de glicose, a constante cinética foi de $0,063 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$, enquanto que para os experimentos com glicose a constante foi de $0,162 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$. Dessa forma, a adição de glicose resultou efetivamente em aumento na velocidade de conversão do inseticida. Na fase experimental, com atrazina e esporos de *Aspergillus niger* AN400, a presença do substrato primário (glicose) não teve influência na remoção de atrazina, sendo que os percentuais de remoção foram muito próximos aos percentuais encontrados nos reatores sem glicose. O estudo cinético, nessa fase com atrazina e esporos, revelou que para os experimentos sem a adição de glicose, o valor da velocidade de conversão de atrazina (R_{ATZo}) foi $0,023 \text{ d}^{-1}$, enquanto que para os experimentos com glicose (R_{ATZo}) foi $0,022 \text{ d}^{-1}$. Portanto, a adição de glicose parece não ter influenciado significativamente a velocidade de remoção do herbicida por *Aspergillus niger* AN400. O teste de toxicidade demonstrou que metil paration e atrazina não inibiram o crescimento do fungo nas várias concentrações testadas, inclusive nas mais elevadas, que foram 60 mg/L e 25 mg/L para metil paration e

atrazina, respectivamente. No reator de leito fixo a remoção de metil paration foi de 40% com 12 h de tempo de detenção hidráulica, e 0,5 g glicose/L. Porém, quando a concentração de glicose foi duplicada a remoção de metil paration diminuiu para 35%. Neste reator o pH se manteve na faixa ácida 3,4 a 5,2, considerada ideal para os fungos. Os resultados encontrados mostram a viabilidade dos fungos para remoção desses pesticidas, considerados persistentes no ambiente.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, metil paration, atrazina, reatores biológicos, água.

ABSTRACT

SAMPAIO, G. M. M. S. (2005) Removal of methyl parathion and atrazine in reactors with fungi. Thesis (Doctorate) - School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2005.

In this study the removal of methyl parathion was evaluated - insecticide and atrazine - herbicide present in water, in reactors with fungi. The research was divided in four stages: operation in batch reactors with methyl parathion and micelium fungus, with and without glucose; toxicity test in plates with *Aspergillus niger* AN400; operation in batch reactors with the pesticides atrazine and methyl parathion and spore of *Aspergillus niger* AN400, with and without glucose; and operation in reactors of fixed bed and ascending flow. In the first stage the removal of methyl parathion was 97% in reactors without glucose and 94% in reactors with glucose in 32 days of reaction time. In the operation in batch with spores, a kinetic model of first order represented very well the speed of decline of the methyl parathion in this step, in the reactors that contained glucose, mainly. For the experiments without the glucose addition, the kinetic constant was $0,063 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$, and for the experiments with glucose the constant was of $0,162 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$. In that way, the glucose addition resulted in increase in the speed of conversion of the insecticide. In the experimental step with atrazine and spores of *Aspergillus niger* AN400, the presence of the primary substratum (glucose) didn't have influence in the atrazine removal, and the percentile removal lays very close to the percentile found in the reactors without glucose. The kinetic study, in that step with atrazine and spores, revealed that for the experiments without the glucose addition, the value of the speed conversion of atrazine (R_{ATZ_0}) was $0,023 \text{ d}^{-1}$, and for the experiments with glucose (R_{ATZ_0}) was $0,022 \text{ d}^{-1}$. Therefore, the glucose addition seems not to have influenced significantly the speed of removal of the herbicide for *Aspergillus niger* AN400. The toxicity test demonstrated that methyl parathion and atrazine didn't inhibit the growth of fungi in the several concentrations, including in high concentrations, that were tested 60 mg/L and 25 mg/L to methyl parathion and atrazine, respectively. The reactor of fixed bed got removal of methyl parathion of 40% in 12 hours of detention

hydraulic, in 0,5 g glucose/L. However, when the glucose concentration was doubled the removal of methyl parathion decreased to 35%. In this reactor the pH kept in the acid strip (3,4 – 5,2), considered ideal for the fungi, and conductivity values didn't favor the hydrolysis of the insecticide. The found results show the viability of the fungi for removal of those pesticides, considered recalcitrant to the environment.

Key words: *Aspergillus niger*, methyl parathion, atrazine, biological reactors, water.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1: Estrutura química do Metil Paration	8
Figura 4.2 – Estrutura química da atrazina	10
Figura 5.1 – Garrafas de Roux com as espécies fúngicas identificadas	39
Figura 5.2 – Reatores de controle, PF e PFG em batelada	40
Figura 5.3: Espectro no UV do metil paration	41
Figura 5.4 – Espectro no UV da Atrazina	48
Figura 5.5 – Esquema do reator de leito fixo e fluxo ascendente empregado na pesquisa, para remoção de metil paration.....	49
Figura 6.1: Variação da concentração de metil paration em função do tempo de reação (TR) da operação em batelada nos reatores de controle, PF e PFG.....	51
Figura 6.2 - Variação do pH em função do tempo de reação (TR) da operação em batelada nos reatores de controle, PF e PFG	52
Figura 6.3a: Cromatograma do metil paration (controle) para o tempo de reação de 0 dia	54
Figura 6.3b: Cromatograma do metil paration (controle) para o tempo de reação de 32 dias	55
Figura 6.3c: Cromatograma do metil paration (PF) para o tempo de reação de 0 dia	55
Figura 6.3d: Cromatograma do metil paration (PF) para o tempo de reação de 32 dias	56
Figura 6.3e: Cromatograma do metil paration (PFG) para o tempo de reação de 0 dia .	56
Figura 6.3f: Cromatograma do metil paration (PFG) para o tempo de reação de 32 dias	57
Figura 6.4a: Consumo de metil paration e aumento da concentração de SSV em função do tempo de reação nos reatores PF	58
Figura 6.4b: Consumo de metil paration e aumento da concentração de SSV em função do tempo de reação nos reatores PFG	58
Figura 6.5 – Aspecto visual do crescimento da biomassa no interior dos reatores PF; PFG e C.	59

Figura 6.6 – Variação da concentração de metil paration em função do tempo de reação nos reatores controle (C)	61
Figura 6.7 – Variação da concentração de metil paration em função do tempo de reação nos reatores PF	62
Figura 6.8 – Variação da concentração de metil paration em função do tempo de reação nos reatores PFG	63
Figura 6.9 – Perfil de sólidos suspensos voláteis nos reatores PF e PFG	65
Figura 6.10 - Variação da concentração de atrazina em função do tempo de reação (TR) nos reatores de controle	67
Figura 6.11 – Variação da concentração de atrazina em função do tempo de reação (TR) nos reatores AF	67
Figura 6.12 – Variação da concentração de atrazina em função do tempo de reação (TR) nos reatores AFG	68
Figura 6.17 – Variação do pH com TDH de 12 h e 0,5 g/L de glicose	71
Figura 6.18 - Variação da condutividade com TDH de 12 h e 0,5 g/L de glicose	71
Figura 6.19 – Variação da DQO com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L.....	72
Figura 6.20 – Variação da concentração de metil paration com TDH de 12 h e 0,5 g de glicose/L	73
Figura 6.21 – Variação do pH com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L após alimentação com meio de cultura Sabouraud.....	74
Figura 6.22 – Variação da condutividade com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L após alimentação com meio de cultura Sabouraud	74
Figura 6.23 – Variação da DQO com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L após passagem pelo meio de cultura Sabouraud	75
Figura 6.24 – Variação da concentração de metil paration com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L após passagem pelo meio de cultura Sabouraud	75
Figura 6.25 – Variação do pH com TDH de 12 h e 1,0 g glicose/L	76
Figura 6.26 – Variação da condutividade com TDH de 12 h e 1,0 g glicose/L	77
Figura 6.27 – Variação da concentração de metil paration com TDH de 12 h e 1,0 g de glicose/L	77
Figura 6.28 – Variação da DQO com TDH de 12 h e 1,0 g de glicose/L	78

Figura 6.29 – Variação de metil paration no ciclo com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L; após passagem do meio de cultura Sabouraud com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L e com TDH de 12h 1,0 g glicose/L.....	79
Figura 6.30 – Reator com 0,5 g glicose/L.....	80
Figura 6.31 – Reator com 1,0 g glicose/L.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Propriedades físicas do metil paration.....	8
Tabela 4.2: Propriedades físicas da atrazina	11
Tabela 5.1 – Composição química – Solução de Vishniac	42
Tabela 5.2 – Concentrações de metil paration e atrazina empregadas no teste de toxicidade.....	43
Tabela 5.3 – Composição dos substratos	44
Tabela 5.4 – Concentrações iniciais de metil paration empregadas na primeira etapa da fase em batelada com esporos de <i>Aspergillus niger</i> AN400	45
Tabela 5.5 – Concentrações iniciais de atrazina empregadas na segunda etapa da fase em batelada com esporos de <i>Aspergillus niger</i> AN400	46
Tabela 6.1: Velocidades iniciais de reação para experimentos com e sem glicose.....	64
Tabela 6.2 – Concentrações iniciais de metil paration nos reatores com micélio de fungos e com esporos fúngicos de <i>Aspergillus niger</i> AN400.....	64

1. INTRODUÇÃO

A prática mundial do uso de pesticidas, por longos períodos e de forma abusiva, tem preocupado as autoridades envolvidas com saúde pública e sustentabilidade dos recursos naturais, em consequência da contaminação ambiental.

O potencial de contaminação destes componentes químicos em águas e sedimentos é elevado devido às suas propriedades físicas e químicas como solubilidade e adsorção. O fator agravante desta poluição é, principalmente, o poder de persistência destes compostos na natureza, formando uma cadeia de transferência de seus efeitos tóxicos aos animais e ao ser humano através da ingestão de água e alimentos contaminados.

Os fatores que estão diretamente relacionados com a persistência e toxicidade desses compostos no ambiente são: mobilidade no solo e na água, meia-vida no solo e na água, frequência de aplicação, condições climáticas e de irrigação (SUDO et al. 2002).

Segundo a Fundação Nacional de Saúde, existem no Brasil cerca de 400 princípios ativos utilizados na agricultura, distribuídos em aproximadamente 700 marcas comerciais. Apesar do grande número comercializado, apenas 22 tipos de agrotóxicos estão previstos para serem monitorados na Portaria nº 518 de 25/03/2004 do Ministério da Saúde que regula a qualidade de água para consumo humano. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola – SINDAG (2002), os inseticidas representam 25,9% dos agroquímicos comercializados no Brasil. O mercado de agroquímicos movimenta US\$ 30 bilhões e o Brasil é o quinto maior consumidor de pesticidas, e movimenta US\$ 2,5 bilhões, sendo a maior parcela representada pelos herbicidas tanto no âmbito mundial quanto no Brasil (MACÊDO, 2002).

Dentre os Estados nordestinos, o Ceará ocupa o terceiro lugar na comercialização de defensivos agrícolas (SINDAG, 2002), sendo metil paration o inseticida mais vendido nesse Estado (RELATÓRIO TÉCNICO AGRÍPEC, 2000).

O organofosforado metil paration (tiofosfato de dimetil - paranitrofenila) com

concentração do ingrediente ativo de 600 g/L, é inflamável e não corrosivo. A ação sobre o meio ambiente é de curta persistência e de pequeno deslocamento. A intoxicação por este organofosforado é devida à inibição da enzima acetilcolinesterase, permitindo desta forma o acúmulo de acetilcolina, que age em nível de sistema nervoso central, podendo levar à morte por falência respiratória (HERNANDEZ et al. 1998). Seu uso destina-se a uma variedade de pragas em diversas culturas.

Atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) é um herbicida da classe dos triazínicos, usada intensivamente no controle de ervas daninhas. Sua estrutura química é representada por um anel triazínico substituído com Cl, etilamina e isopropilamina, a qual a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente (RITTER, 1990). O mecanismo de ação ocorre através de inibição da fotossíntese, por bloquear o transporte de elétrons na reação de Hill do fotossistema II (YANZE KONTCHOU e GSCHWIND, 1995).

Em muitos países, incluindo EUA, Canadá, França, Espanha e Alemanha tem sido registrada a presença de atrazina em águas superficiais e subterrâneas (KRÝSOVÁ et al. 2003), devido à sua baixa adsorção às partículas do solo e à moderada solubilidade em água, cerca de 33 mg/L a 20° C (DI PALMA et al. 2003).

O concentração máxima permitida para atrazina em água, nos EUA, é de 0,1 µg/L e segundo a EPA desde 1992 o nível máximo de contaminação é de 3 µg/L (YASSIR et al. 1999). No Brasil, a Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) que estabelece o padrão de potabilidade para consumo humano limita o valor máximo em 2 µg de atrazina/L. A legislação européia restringe a ocorrência de pesticida individual em água potável em 0,1 µg/L e para um conjunto de pesticidas em 0,5 µg/L (FEAKIN et al. 1994).

Muitas pesquisas têm buscado soluções para eliminar estes pesticidas por serem considerados nocivos ao meio ambiente e à saúde do homem. Dentre os métodos de remoção de pesticidas de água existem: degradação por radiação ultravioleta na presença de ácido húmico (SANTOS e REZENDE, 1999), degradação utilizando radiação gama (LUCHINI et al. 1999), adsorção com fibras de carvão ativado (AYRANCI e HODA, 2005; MARTIN-GULLÓN e FONT, 2001), ozonização catalizada por manganês (MA e GRAHAM, 2000), adsorção em argila orgânica (PAL e VANJARA, 2001), adsorção em carvão ativado em pó (CAMPOS et al. 2000) processo de nanofiltração (BOUSSAHEL et al., 2000), fotodegradação em solução de Fe(ClO₄)₃ e suspensão de TiO₂ (KRÝSOVÁ et al. 2003); peroxidação (DI PALMA et al. 2003);

tratamento anódico Fenton (SALTIMIRAS e LEMLEY, 2002). Todos esses métodos de remoção são de natureza física, química ou físico-química e, na maioria das vezes, podem demandar custos mais elevados, quando comparados aos processos biológicos de tratamento.

Como a atividade microbiana destaca-se como fator importante na remoção de compostos químicos do ambiente, os fungos têm sido empregados, em processos biológicos, para remoção desses compostos de difícil degradação.

Os fungos são capazes de reciclar compostos como lignina, celulose, quitina, melanina e queratina, além de serem altamente versáteis no metabolismo de xenobióticos (PRENAFETA BOLDU, 2002).

Algumas espécies fúngicas são bastante empregadas para remoção de compostos de difícil degradação devido a sistemas enzimáticos específicos, tais como: ligninase, manganês peroxidase, citocromo P450 monooxigenase, entre outros.

Garcia et al. (2000) utilizaram as espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum* para remoção de compostos fenólicos; Volke-Sepulveda et al. (2003) estudaram a biodegradação de hexadecano, através de processos de fermentação, com *Aspergillus niger*; Bruce et al. (1995) investigaram a degradação de pentaclorofenol pelas espécies fúngicas: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Inonotus dryophilus*; Bending et al. (2002) estudaram a degradação de pesticidas empregando fungos brancos da madeira.

Considerando a habilidade dos fungos em degradar compostos recalcitrantes, o uso indiscriminado de pesticidas na agricultura, a escassez de água de boa qualidade e os custos da maioria dos processos de natureza física e química para tratamento de água, esta pesquisa teve como principal objetivo investigar a remoção dos pesticidas: metil paration e atrazina, em água, com solução de nutrientes e cloranfenicol – antibiótico de largo espectro, através do emprego de reatores biológicos com fungos (RBF).

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a capacidade de fungos filamentosos *Aspergillus niger* AN400 para remover metil paration e atrazina de água sintética, suplementada com glicose e solução de micronutriente, em reatores de bancada em regime de batelada e em fluxo contínuo.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a toxicidade de metil paration e atrazina ao *Aspergillus niger* AN400, em várias concentrações;
- Verificar o efeito da glicose – fonte primária de carbono na remoção de metil paration e atrazina nos reatores em batelada;
- Estimar parâmetros cinéticos aparentes na operação com reatores em batelada;
- Comparar a eficiência de remoção de metil paration em reatores em batelada, empregando fungo nas formas morfológicas micelial e esporulada;
- Estudar a remoção de metil paration por *Aspergillus niger* AN400 em reatores de leito fixo e fluxo ascendente;
- Testar o poder de adsorção do meio suporte – manta agulhada de poliamida, aos pesticidas atrazina e metil paration;
- Avaliar a remoção de metil paration no reator de leito fixo e fluxo ascendente com tempo de detenção hidráulica (TDH) de 12 h.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Pesticidas – Metil paration e Atrazina

Os primeiros pesticidas surgiram nos anos 40, mas somente após décadas de uso, é que se percebeu o prejuízo que esses compostos traziam aos organismos, inclusive ao ser humano (MACÊDO, 2002).

Raquel Carson em 1962 publicou “Primavera Silenciosa”, sendo esta a primeira obra a detalhar os efeitos adversos da utilização dos pesticidas, iniciando assim, um debate sobre as implicações da atividade humana sobre o ambiente e o custo ambiental dessa contaminação para sociedade.

No Brasil no início dos anos 50, os inseticidas fosforados foram introduzidos para substituírem o DDT, porém esta substituição veio acompanhada de uma técnica terrível, que consistia em mexer as formulações com a mão. Entretanto, quando o trabalhador realizava tal proeza, com paration, primeiro organofosforado utilizado no Brasil, caía morto, fulminado; fato este observado em várias regiões do país (HISTÓRIA DOS AGROTÓXICOS, 2005).

Outro fato importante foi o uso de um herbicida desfolhante, conhecido como “agente laranja”, o qual foi utilizado na Guerra do Vietnã entre 1954 a 1975, com o objetivo de acabar com os esconderijos dos soldados vietnamitas na floresta. Tal feito, não consistiu apenas de uma operação militar aparentemente bem sucedida pelos americanos, mas sim um desastre ecológico com conseqüências sobre a fauna, a água dos rios e dos mares, e sobre o ser humano. O herbicida que compõe o agente laranja é sempre acompanhado de dioxina, que é o composto mais ativo entre os causadores de deformações fetais (HISTÓRIA DOS AGROTÓXICOS, 2005).

Consome-se, no mundo, cerca de duas mil toneladas de agrotóxicos por ano, dos quais 24% são consumidos nos EUA, 45% na Europa e 25% no resto do mundo (GUPTA, 2004).

Há padrões de qualidade e quantidade para os pesticidas, sendo sua produção, comércio e uso dependentes de registro prévio, o qual está condicionado ao grau de perigo que o produto representará para o ambiente. Além disso, estes pesticidas só podem ser comercializados com rótulos que informem sobre seus perigos, possíveis efeitos prejudiciais, precauções e instruções para caso de acidentes. De acordo com a toxicologia, os agrotóxicos são classificados como: CLASSE I – extremamente tóxico; CLASSE II – altamente tóxico; CLASSE III – medianamente tóxico e CLASSE IV – pouco ou muito pouco tóxico. De acordo com a dose letal 50 (DL50) são classificados como: Extremamente tóxico – DL50 menor ou igual a 5 mg/kg; Altamente tóxico – DL50 entre 5 e 50 mg/kg; Medianamente tóxico – DL50 entre 50 e 500 mg/kg; Pouco tóxico – DL50 entre 500 e 5000 mg/kg; Muito pouco tóxico – DL50 maior ou igual a 5000 mg/kg (FUNASA, 2002).

De modo geral os pesticidas são subdivididos em: inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas e fumigantes. Embora a seletividade seja extremamente desejável, todos produzem, pelo menos, algum efeito tóxico no ser humano (GOODMAN et al. 1987).

Segundo Dávila-Vasquez et al. (2005) os pesticidas são os únicos produtos químicos produzidos para serem deliberadamente tóxicos e introduzidos no meio ambiente. Apenas 5% destes pesticidas reagem com os organismos alvo, o restante se dissipa no solo, na água e no ar.

Os resíduos de pesticidas quando entram nos agroecossistemas contaminam e afetam os compartimentos agrícolas como: a atmosfera através do processo de evaporação, as águas superficiais através do escoamento superficial e as águas subterrâneas por meio de lixiviação. Na realidade os pesticidas não só contaminam, como também permanecem no ambiente por longo tempo, mesmo depois do desuso, desencadeando efeito de acumulação e biomagnificação ao longo da cadeia trófica.

Nesta pesquisa os dois pesticidas abordados foram metil paration – inseticida e atrazina – herbicida. Ambos bastante utilizados no Brasil e no mundo com reflexos negativos sobre o meio ambiente.

Metil paration (Figura 4.1) pertence à classe dos organofosforados e age por inibição da enzima acetil colinesterase, sendo o sistema nervoso periférico autônomo, o primeiro a manifestar sinais de envenenamento, caracterizados por náuseas, suores, sensação de compressão do tórax, diarreia, salivação, miose, edema pulmonar, dores de

cabeça, convulsões e estado de coma. A inibição da enzima é considerada irreversível permanecendo íntegra por até mais de 100 horas (PAIVA E ADAMI, 2002).

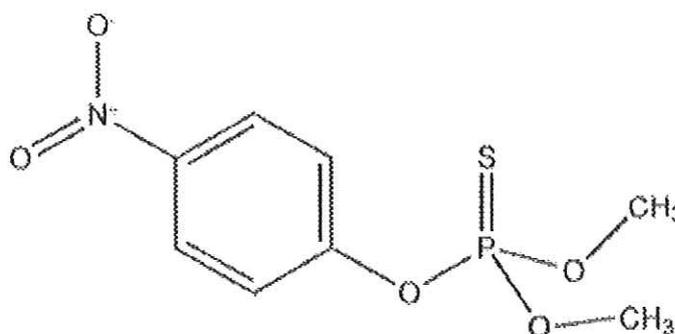


Figura 4.1: Estrutura química do Metil Paration

Fonte: International Programme on Chemical Safety (IPSC) – Health e Safety Guide No. 75

Na Tabela 4.1 estão apresentadas as propriedades físicas do metil paration.

Tabela 4.1: Propriedades físicas do metil paration

Propriedades Físicas	
Fórmula Molecular	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS
Massa Molecular	263,2
Ponto de Fusão	35 a 38°C
Ponto de Ebulição	143°C
Densidade	1,358 g/L
Pressão de vapor (20°C)	1,3 mPa
Solubilidade em água (25°C)	55 – 60 mg/L
Coefficiente de partição	1,81 a 3,43

Fonte: International Programme on Chemical Safety (IPSC) – Health e Safety Guide No. 75

Metil paration é altamente tóxico, tanto por via oral quanto por via dérmica, com toxicidade Classe I – extremamente tóxico. Exerce efeitos tóxicos crônicos e agudos, efeitos sobre a reprodução, porém efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos ainda não foram relatados. Atinge rapidamente a circulação sanguínea, quando

absorvido por rota dérmica, ou oral alcançando altas concentrações nos tecidos do corpo, dentro de 1 a 2 horas (EPA, 1991).

Metil paration é bastante empregado para o controle de insetos, principalmente durante a colheita do algodão. Com relação aos efeitos ecológicos, é altamente tóxico para os pássaros, e invertebrados aquáticos, como *Daphnia sp*, e moderadamente tóxico para peixes e seus consumidores (EPA, 1991).

No meio ambiente, metil paration é considerado de persistência baixa a moderada com meia-vida de 1 a 30 dias. Sua velocidade de degradação aumenta com a temperatura e a exposição solar. É moderadamente adsorvido pelo solo, mas um de seus subprodutos – 4-nitrofenol não é bem adsorvido, constituindo-se, assim, em um potente poluidor de águas subterrâneas. A degradação de metil paration em água é considerada rápida, porém mais lenta em águas marinhas do que em águas doces (EPA, 1991).

As principais rotas de dissipação para metil paration são degradação microbiana, fotólise aquosa, hidrólise e incorporação à matéria orgânica do solo. Sua hidrólise é lenta com meia vida de: 68 dias em pH 5; 40 dias em pH 7 e 33 dias em pH 9 (EPA, 1991).

Atrazina é um composto aromático heterocíclico com nitrogênio substituindo carbono em três posições (Figura 4.2) e devido à essa substituição, a degradação é significativamente diferente dos compostos aromáticos homocíclicos. É um composto polar, fracamente básico e sua estabilidade pode ser explicada pela configuração eletrônica do anel heterocíclico (JAVARONI, et al. 1999; GU et al. 2003).

É um herbicida seletivo da classe dos triazínicos, classificado como de uso restrito, devido ao seu grande potencial de contaminação de águas subterrâneas. Possui toxicidade Classe III – medianamente tóxico e é bastante empregada no controle de ervas daninhas nas plantações de milho, sorgo e abacaxi, entre outros (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPSC) – Health e safety guide No. 47; FUNASA, 2002).

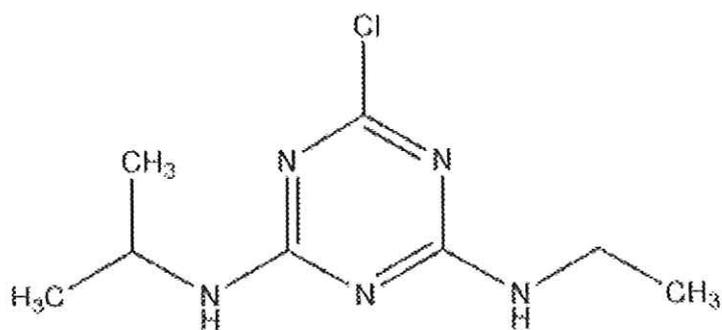


Figura 4.2 – Estrutura química da atrazina

Fonte: International Programme on Chemical Safety (IPSC) – Health e Safety Guide No. 47

Atrazina possui toxicidade aguda de leve a moderada para humanos e outros animais. As vias de absorção são oral, dérmica ou por inalação, e entre os sintomas estão dores abdominais, diarreia e vômitos e irritação dos olhos e mucosas.

No desenvolvimento de toxicidade crônica os principais órgãos envolvidos são fígado, coração, músculos, ovários, rins e o sistema endócrino. Não existem relatos de efeitos sobre a reprodução, nem sobre efeitos teratogênicos. Porém, com relação aos efeitos carcinogênicos, existem relatos de tumor mamário em ratas (EPA, 2003). Doses letais de atrazina em testes com animais têm causado congestão e ou hemorragias nos músculos, rins, fígado, baço, cérebro e coração (STEVENS e SUMNER, 1991).

Com relação aos efeitos ecológicos é praticamente não tóxica para pássaros e levemente tóxica para peixes e outros organismos aquáticos (EPA, 2003).

Atrazina é um contaminante potencial de águas devido às suas características como: alto potencial de escoamento, persistência no solo, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade em água baixa a moderada, absorção moderada pela matéria orgânica e pela argila (UETA et al. 2002).

No ambiente, é altamente persistente, podendo permanecer no meio por um ano ou mais (EPA, 2003). Devido ao fato de não ser fortemente adsorvida pelo solo, e ser dotada de meia-vida longa (60 a 100 dias), tem elevado potencial para contaminação de água subterrânea apesar da moderada solubilidade em água de 33 mg/L (PROTZMAN et al. 1999). A biodegradação é considerada o processo mais importante de remoção de atrazina no meio ambiente e são muitos os microrganismos isolados de ecossistemas aquáticos e do solo capazes de degradar atrazina (EPA, 2003).

Na Tabela 4.2 estão apresentadas as principais propriedades físicas da atrazina.

Tabela 4.2: Propriedades físicas da atrazina

Propriedades Físicas	
Fórmula Molecular	$C_8H_{14}ClN_5$
Massa Molecular	215,98
Ponto de Fusão	173 a 175 °C
Ponto de ebulição	279 °C
Densidade	1,358 g/L
Pressão de vapor (20°C)	7.34×10^{-4} mm Hg
Solubilidade em água (25°C)	33 mg/L
Coefficiente de partição	2,82
Coefficiente de adsorção	100

Fonte: EPA (2003)

4.2 Estudos sobre remoção de pesticidas

A grande variedade de pesticidas usada faz com que cada vez torne-se mais difícil o emprego de métodos de remoção desses compostos do ambiente. Segundo Asku (2005) os métodos de tratamento de natureza fotoquímica e química são freqüentemente ineficientes para remoção de pesticidas organoclorados sintéticos. Entretanto, frente a outros tipos de pesticida como os organofosforados e os herbicidas triazínicos esses métodos têm mostrado resultados mais promissores.

Beltran et al. (1998) avaliaram a degradação de atrazina e seus subprodutos dietilatrazina e deisopropilatrazina, em solução aquosa, por ozônio e peróxido de hidrogênio. Os experimentos foram realizados em reatores de vidro com volume de 4 L, operados em regime de semi-batelada. A concentração de alimentação de ozônio foi de 16 mg/L. O reatores foram alimentado com solução aquosa de atrazina tamponada e seus subprodutos na concentração de 5×10^{-5} M e peróxido de hidrogênio de 0 a 0,2 M, pH 7, temperatura de 20°C. A velocidade de degradação de atrazina pelo sistema O_3/H_2O_2 foi máxima, quando a concentração de peróxido de hidrogênio foi de 10^{-3} a 10^{-4} M, e dos subprodutos dietilatrazina e deisopropilatrazina, quando a concentração de

peróxido de hidrogênio foi de 10^{-2} a 10^{-3} M. A importância da contribuição dos radicais hidroxila, gerados a partir da reação entre ozônio e peróxido de hidrogênio, no mecanismo de oxidação, foi deduzida depois de checar o efeito de inibidores – íons bicarbonato/carbonato, sobre a degradação de atrazina e seus subprodutos, e os autores verificaram que a velocidade de degradação diminuía significativamente. Os autores também concluíram que a relação ótima entre O_3/H_2O_2 para a completa eliminação de atrazina e seus metabólitos foi de 2:6.

Oxidação avançada é um processo que gera radicais hidroxila, que possuem grande capacidade de oxidação na degradação de micropoluentes orgânicos como os pesticidas, os quais são resistentes à degradação apenas com ozônio (MA e GRAHAN 2000). São vários os processos de oxidação avançada, como: UV/ H_2O_2 , O_3/H_2O_2 , UV/ TiO_2 , UV/ O_3 . Entretanto, maior atenção tem sido dada ao processo de oxidação catalizada por metais devido à sua potencialidade e baixo custo. (MA e GRAHAN, 1997) relataram que a presença de pequena quantidade de Mn^{2+} (1 mg/L) aumentou significativamente a oxidação de atrazina por ozônio e, ao mesmo tempo, o ozônio residual presente na solução aquosa diminuiu com o aumento da dosagem de Mn^{2+} , sugerindo a possibilidade do mecanismo radicalar como responsável inicial da oxidação da atrazina por ozônio catalizada por Mn^{2+} . Em outro estudo (MA e GRAHAN, 1998) mostraram que a presença de pequena quantidade de substâncias húmicas (1 mg/L) acelera a degradação de atrazina por oxidação com ozônio catalizada por Mn^{2+} porém, concentrações elevadas de substâncias húmicas diminuem a velocidade de degradação da atrazina. Ma e Grahan (1998) estudaram a influência de radicais de varredura (bicarbonato e terc-butanol) na remoção de atrazina empregando processo de ozonização catalizada por manganês, e verificaram que estes radicais tiveram efeito negativo na oxidação da atrazina. O aumento na concentração de íons bicarbonato causou redução sistemática na degradação da atrazina. Efeito de varredura muito maior ocorreu na presença do terc-butanol que teve a velocidade de reação aumentada com radicais hidroxila. Este experimento confirma que a degradação da atrazina por ozonização com Mn^{2+} é uma reação tipicamente radicalar, pois gera radicais hidroxila que têm elevado potencial de oxidação sobre a atrazina.

Saltimiras e Lemley (2002) investigaram a eficiência de degradação de atrazina e seus subprodutos, aplicando método Fenton anódico. O experimento eletroquímico consistia de duas células eletrolíticas conectadas por uma ponte salina com solução saturada de cloreto de sódio. Na célula anódica foram colocados 200 mL de solução de

atrazina na concentração de 135 μM e eletrodo de ferro e na célula catódica solução de água deionizada com eletrodo de grafite, a corrente elétrica foi de 0,12 A. Solução de peróxido de hidrogênio a 30% foi bombeada para a célula anódica em velocidade de 0,5 mL/min com o objetivo de manter a relação $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2$ de 1;10. Os resultados mostraram que a concentração de atrazina foi rapidamente reduzida a 1 % em 3 min. Os autores chegaram à conclusão que o tratamento Fenton anódico é um método promissor e eficiente para degradar atrazina, sendo assim útil como tratamento e pré-tratamento de água e esgoto contaminado com este herbicida. A desalquilação seguida de descloração é a principal via de degradação.

Lichini et al. (1996) estudaram a aplicação de ^{60}Co para induzir a degradação de paration, bem como paraa identificarem os principais produtos da radiólise em metanol. Os raios gama foram oriundos de um 'Gammabeam 650' com atividade de $6,99 \times 10^{13}$ Bq, a temperatura ambiente. Paration e o correspondente composto marcado foi preparado em metanol a uma concentração de 95 mg/L e atividade de 1,73 $\mu\text{Ci/L}$. As doses de irradiação a esta solução foram de: 0; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 20; 30; 40 e 50 kGy, a 3,12 kGy/h. Radiação de 30 kGy/h degradou aproximadamente 99% do pesticida e os produtos de degradação foram: paraoxon, p-aminofenol e aminoparation. Em estudo anterior semelhante a esse, apenas com solvente diferente, no caso água, a dose necessária para alcançar o percentual de 99% de degradação do paration foi muito menor. O comportamento diferenciado da radiólise do paration nesses dois solventes indica que a degradação do pesticida por raios gama foi provavelmente devida ao efeito indireto da radiação na molécula do pesticida.

Ghauch et al. (2000) investigaram o tratamento de água contaminada com atrazina e paration usando processo de degradação redutiva, cujo agente redutor foi pó de ferro valência zero (ZVIP), e detectaram rápido decréscimo dos pesticidas atrazina (1 ppm) e paration (0,1 ppm) para quantidades indetectáveis em apenas 30 minutos. Ghauch e Suptil (1999) estudaram a remoção de triazinas (atrazina, simazina e propazina) em água empregando o ZVIP e verificaram que, em 60 minutos de contato com o agente redutor, ocorreu completo desaparecimento das triazinas, concluindo que o uso de ferro como agente redutor constitui um bom sistema metálico para o tratamento de água contaminada com atrazina, simazina e propazina, além de seu baixo custo.

Santos e Rezende (2002) estudaram o comportamento fotoquímico do pesticida paration etílico em água, na ausência e presença de ácidos húmicos. Os experimentos foram realizados em um reator cilíndrico de 400 mL equipado com uma jaqueta de

quartzo. Para a fonte de luz UV foi utilizada uma lâmpada de mercúrio de média pressão (450 W). As soluções irradiadas foram preparadas na concentração de 10 mg paration etílico/L em tampão fosfato (0,025 mol/L) pH 5,50 e 7,25, na ausência e presença de ácidos húmicos (10 mg/L). As soluções foram preparadas com água deionizada e água natural de um reservatório de captação superficial. O tempo de realização da exposição fotoquímica foi de 30 min, sendo retiradas alíquotas de 10 mL nos tempos de 2; 5; 10; 15; 20; 25 e 30 min. Também foi realizado um experimento fotoquímico com água deionizada, sem substâncias húmicas e as alíquotas de 10 mL foram retiradas em intervalos de 1 h por um período de 8 h de irradiação. Após a irradiação, as amostras foram acondicionadas no escuro por 30 dias a 5°C. A degradação total do paration ocorreu em 25 e 30 min na ausência e presença de ácidos húmicos. Os resultados demonstraram que os ácidos húmicos pouco influenciaram na velocidade de fotodegradação do pesticida. As constantes cinéticas de primeira ordem foram 0,161 min⁻¹ e 0,138 min⁻¹ na presença e ausência de ácidos húmicos, respectivamente. No pH de 7,25 a degradação total do paration ocorreu em 15 min na presença de ácidos húmicos e em 20 min na ausência. Demonstrando assim, pouca influência dos ácidos húmicos. No entanto, os autores verificaram que as constantes de velocidade de fotodegradação em pH 5,50 e 7,25, na ausência de ácidos húmicos, aumentou com o aumento do pH. A velocidade de fotodegradação aumentou 0,088 unidade quando se passou de pH de 5,50 para 7,25. Porém, quando se acrescentaram ácidos húmicos a velocidade aumentou 0,026 unidade e o efeito combinado, do pH e dos ácidos húmicos foi negligenciável (0,004 unidade) indicando que não existe correlação entre as variáveis. A fotodegradação do paration em água deionizada foi quase total com 120 min de irradiação, quando o comprimento da lâmpada foi de 11 polegadas, porém com uma lâmpada de comprimento menor, 5 polegadas, a fotodegradação ocorreu em 30 min. Outros experimentos foram realizados, variando o comprimento de onda, mantendo o pH em 7,25 e na ausência de ácidos húmicos. Com comprimento de onda de 313 nm a fotodegradação foi extremamente lenta quando comparada com 280 nm. A porcentagem de fotoprodutos formados foi muito pequena, sugerindo, também a destruição destes, pela radiação UV.

Chan et al. (2004) estudaram a degradação de atrazina por oxidação fotocatalítica associada com processo biológico. Na etapa de oxidação foram utilizados dióxido de titânio e peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações e luz ultravioleta para degradar 10 mg/L, de atrazina, numa mistura contendo 100 mL. Após 60 minutos de

irradiação com luz ultravioleta e com 30 mMol de H₂O₂ e 150 mg/L, de TiO₂, 94% da atrazina foi degradada e após 2 h de irradiação o ácido cianúrico passou a ser detectado, sendo a conversão de atrazina em ácido cianúrico de aproximadamente 80%, ou seja, dos 10 mg/L, de atrazina foram produzidos 4,9 mg/L, de ácido cianúrico. Realizado o processo de oxidação fotocatalítica, foi preparado um meio com pH 7 a 30°C sob agitação de 200 rpm para a biodegradação do ácido cianúrico (4,9 mg/L) pela bactéria *S. Capsulata* isolada a partir do solo, capaz de degradar o metabólito do processo de fotodegradação. Os resultados mostraram que, após nove dias de incubação, ocorreu o desaparecimento completo do ácido cianúrico. Os autores concluíram que foram necessários 12 dias para a completa mineralização da atrazina, através da combinação: oxidação fotocatalítica com processo biológico.

Por outro lado, segundo Konstantinou et al. (2000) e Asku (2005), o processo de tratamento avançado com adsorção em carvão ativado, tem sido considerado o método mais eficiente para remoção de pesticidas dissolvidos em soluções aquosas. De acordo com Asku (2005), apesar da eficiência de remoção de pesticidas por carvão ativado, este método apresenta desvantagens por ser muito caro, sendo que a regeneração do carvão, tanto química quanto térmica, também tem custos elevados, além desta técnica ser impraticável em grande escala. Neste contexto, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de adsorventes alternativos como: quitina, lodo de esgoto carbonizado, solo, bagaço, casca carbonizada, turfa, casca de arroz, casca de eucalipto. Além de biosorção com massa microbiana de bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas vivas e mortas.

Martín-Gullon e Font (2000) investigaram a dinâmica de adsorção de carvão ativado em fibras e granular na remoção de atrazina. A água para preparação da solução de atrazina era de origem subterrânea e pré-tratada. O aparato experimental consistia de uma microcoluna com leito de fibra de carvão ativado e outra com leito de carvão ativado granular, nos quais a solução de atrazina na concentração de 2,5 µg/L era bombeada de forma descendente. As amostras eram coletadas a cada 20 minutos de contato, até alcançar concentração de 0,1 µg/L. No teste com água pré-tratada, a eficiência da fibra de carvão ativado foi sete vezes melhor que o carvão ativado granular. Após esse teste, a fim de verificar se a matéria orgânica presente saturaria a coluna e influenciaria na adsorção de atrazina, a água pré-tratada foi circulada, através da coluna, por três dias, somente a água pré-tratada, a fim de verificar se a matéria orgânica presente saturaria a coluna foi recirculada. Os resultados indicaram que a

presença da matéria orgânica diminuiu a capacidade de adsorção tanto da fibra quanto do carvão granular, sendo mais efetiva com este último.

Ayranci e Hoda (2005) estudaram a capacidade de fibras de carvão ativado para remover os pesticidas aldicarb, almetrim, dinoseb e diuron, presentes em água deionizada. O processo de adsorção seguiu uma cinética de pseudoprimeira ordem e pseudosegunda ordem, num período de 125 minutos. As constantes de velocidade para ambos modelos cinéticos em ordem decrescente foram: dinosed > ametryn > diurm > aldicarb. As isotermas de Langmuir e Freundlich a 25°C representaram bem os dados obtidos no processo de adsorção para estes pesticidas.

Kyriakopoulos et al (2005) estudaram a capacidade de adsorção das resinas amberlite tipo XAD-4 (altamente hidrofóbica) e XAD-7 (mais hidrofílica) para remover os herbicidas amitrole, alaclor, trifluralin e prometrin. Para os experimentos de adsorção os herbicidas foram inicialmente dissolvidos em metanol para, em seguida, serem preparadas as soluções aquosas tamponadas em pH 3,0; 5,0 e 6,5, com concentração para cada herbicida variando de 200 a 1000 mg/L. As soluções juntamente com os adsorventes (0,5 a 1,0 g de peso seco) foram agitadas por 4 h até que o equilíbrio fosse atingido. Para cada parâmetro: tipo de pesticida, tipo de adsorvente, pH e temperatura, foram determinadas as variáveis dos modelos de Freundlich e Langmuir. A resina XAD-4 mostrou-se mais eficiente para remover alaclor e prometrin que a XAD-7 na faixa de pH de 3,0 a 6,5 e temperatura de 15 a 30°C. Entretanto, XAD-7 foi mais efetiva que XAD-4 a 20 e 30°C para remoção de amitrole. As duas resinas mostraram capacidade de adsorção similar para remover trifluralin. Em pH 3,0 as resinas mostraram maior capacidade de adsorção para todos os herbicidas estudados. Porém, o efeito positivo do pH foi mais significativo em XAD-7 e amitrole e XAD-4 com trifluralin e alaclor. O efeito da temperatura, nas isotermas de adsorção, na maioria das vezes, é que com aumento da temperatura, a adsorção diminui. Este efeito foi observado com as duas resinas e os herbicidas trifluralim e prometrin. Porém, com alaclor e as duas resinas, e amitrole e a resina XAD-7, o efeito do aumento da temperatura, aumentou a adsorção. Os autores concluíram que a resina XAD-4 é mais eficiente para os herbicidas hidrófobos alaclor, trifluralim e prometrin, enquanto que, a resina XAD-7 é preferível para os herbicidas mais hidrofílicos como amitrole. O efeito do baixo pH foi positivo na adsorção em ambas as resinas, revelando o desenvolvimento de pontes de hidrogênio e interações polares entre o herbicida e a interface das resinas. Finalmente verificaram que o comportamento anormal na adsorção do amitrole e

alaclor, com relação à temperatura, deve ser devido à alta solubilidade desses compostos em água.

Pal e Vanjara (2001) avaliaram a capacidade das argilas orgânicas caolin, montmorilonita e bentonita em remover os pesticidas malation e butaclor de soluções aquosas. Os experimentos de adsorção foram realizados em erlenmeyer de 250 mL sob agitação, temperatura constante de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, pH entre 6,0 a 6,5, por 24 h, com 25 a 50 mg do adsorvente e 50 mL de solução aquosa de pesticida. As isotermas de adsorção foram representadas pelo modelo de Freundlich e os valores de K_F (constante de Freundlich) indicaram elevada capacidade de adsorção dos pesticidas às argilas orgânicas. Segundo os autores a adsorção dos pesticidas foi governada, principalmente, por interações hidrofóbicas entre as moléculas dos pesticidas e a superfície hidrofóbica das argilas. A adsorção do butaclor foi maior que a do malation às argilas orgânicas, devido à baixa solubilidade do butaclor e às interações hidrofóbicas.

Porém, na técnica de adsorção em filtros com carvão, estes são rapidamente saturados e sua eficiência para removerem pesticidas diminui com o aumento da presença de matéria orgânica natural. Deste modo, remoção de pesticidas por membranas, segundo Boussahel et al. (2000), tem se mostrado, também, como técnica viável.

Boussahel et al. (2000) estudaram a remoção de resíduos de pesticidas (atrazina e seus metabólitos desetilatrazina – DEA, simazina, cianazina, isoproturon e diuron) em água, usando processo de nanofiltração (membranas Desal DK e NF200) e também verificaram a influência da matéria orgânica (ácido húmico) e da matéria inorgânica (sulfato de cálcio e cloreto de cálcio) na quantidade de pesticida removida e adsorvida nas membranas. Os melhores resultados foram obtidos com membranas Desal DK para todos os pesticidas, com exceção do diuron, para o qual a pouca remoção foi explicada por este composto possuir elevado momento dipolar e molécula linear. Com relação à influência da matéria inorgânica, um pequeno efeito foi notado no caso da membrana Desal DK. No entanto, para a NF200 a remoção dos pesticidas aumentou. Por outro lado, a influência do ácido húmico, na remoção dos pesticidas foi maior que a da matéria inorgânica, ou seja, um aumento na percentagem de pesticidas adsorvidos na membrana Desal DK e NF200 foi observado, exceto para o diuron. A influência da matéria inorgânica no aumento da remoção dos pesticidas estudados, exceto diuron, fundamenta-se na formação de macromoléculas.

Nos últimos anos, devido à persistência no ambiente e toxicidade desses compostos, muita atenção tem sido dada para se estudar a habilidade dos microrganismos em metabolizar pesticidas, embora em alguns casos, os produtos do metabolismo microbiano sejam mais tóxicos que os de origem (ASKU, 2005). Na pesquisa de Katz et al. (2001) o objetivo foi investigar a remoção de nitrato e atrazina por *Pseudomonas* ADP. O meio líquido para crescimento da bactéria foi preparado com solução nutriente contendo 15 mg/L, de atrazina. Foi utilizado um reator de leito fluidizado (RLF) com atrazina como única fonte de nitrogênio, citrato como doador de elétrons e carbono e oxigênio como oxidantes. A concentração de atrazina estudada foi 15 mg/L em TDH de 12 h e 0,75 h. Depois de uma semana de operação o oxigênio foi substituído por nitrato. Paralelamente, reatores em regime de batelada foram operados com tempo de reação de 18 h por 18 dias cuja solução de alimentação continha 15 mg/L, de atrazina, sendo dois reatores operados em condições estéreis e dois em condições não estéreis. Os resultados mostraram que a desnitrificação no reator de leito fluidizado foi eficiente, alcançando 95% de remoção de nitrato e a remoção de atrazina foi próxima de 100% no período de 20 a 40 dias, depois diminuiu para 10% com 85 dias e para 25% com 120 dias. No reator em batelada estéril a remoção de nitrato foi de 90 % e de atrazina próxima a 100%. Porém, no reator não estéril até o 11º dia, as remoções de atrazina e nitrato tiveram o mesmo padrão alcançado pelo RLF no período de 20 a 40 dias. No 14º dia a eficiência diminuiu para 10%. Segundo os autores, a queda de eficiência ocorrida nos reatores, foi causada pela contaminação por outras bactérias sem capacidade de remover os compostos em questão. Deste modo, enquanto não havia ocorrido a contaminação do reator de leito fluidizado a eficiência foi excelente e, após a contaminação do reator ocorreu, queda de eficiência que também foi comprovada na etapa em batelada quando os autores trabalharam em condições estéreis e não estéreis.

Feakin et al. (1994) estudaram a biodegradação de atrazina, presente em água, em baixas concentrações. Os biodegradadores da atrazina foram isolados de amostras de solo, filtro de tratamento de água, esgoto industrial e reservatório de água contendo atrazina em baixas concentrações. Foram isoladas 14 espécies de bactérias, sendo oito Gram positivas e seis Gram negativas. A biodegradação da atrazina e simazina foi avaliada em meio de cultura e em água superficial, (concentração de 1 µg/L dos dois herbicidas) os quais foram inoculados com as espécies bacterianas isoladas, incubados por sete dias a 30º C. Somente quatro bactérias foram capazes de degradar atrazina e

simazina, na referida concentração, apenas com água superficial, mas não no meio de cultura.

Cheng et al. (2002) estudaram a remoção dos xenobióticos: paration, ometoate, MCPA (4-cloro-2-metil-ácido fenoxiacético) e dicamba (3,6-dicloro-2-metil-benzoato) de água utilizando terras úmidas construídas consistindo de duas câmaras com as espécies vegetais *Iscacheamun aristanum* e *Colocasia esculenta*. A água sintética foi preparada com 2 µg/L de parathion, 60 µg/L de omethoate, 2,8 µg/L de MCPA e 1,5 µg/L de dicamba. Além dos xenobióticos, foram acrescentados à água: 0,125 mM de glicose; 0,02 mM de Na₂CO₃; 0,023 mM de KCl; 0,111 mM de NH₄Cl; 0,064 mM de NaCl; 0,026 mM de KH₂PO₄ e 0,010 mM de MgSO₄. Após período de adaptação de 120 dias, as eficiências de remoção de paration e ometoate foram 100%. Porém, para os herbicidas MCPA a descontaminação foi menos eficiente, alcançando percentual de 36% e para dicamba não houve remoção.

Gupta et al. (2000) estudaram a degradação dos isômeros α , β , γ e δ do hexaclorociclohexano (HCH) pelas bactérias *Bacillus circulans* e *Bacillus brevis* isoladas de solo contaminado com HCH. Verificaram que a concentração dos isômeros α , γ e δ diminuíram rapidamente em condições aeróbias, alcançando um percentual de degradação superior a 80% com 8 dias de incubação. O isômero β , o mais recalcitrante, nas concentrações de 1 µg/mL e 5 µg/mL foi analisado por um período de 28 dias, a cada intervalo de 7 dias e observou-se que ambas as espécies foram capazes de degradá-lo, em percentuais de 51,3 e 36,3% para *Bacillus circulans* e *Bacillus brevis*, respectivamente.

Ghosh e Philip (2004) pesquisaram a degradação da atrazina sob condições anaeróbias em processo de co-metabolismo e na ausência de fonte externa de carbono e oxigênio. O esgoto sintético continha uma solução de nutrientes e 50 mg extrato de levedura/L de água destilada. As concentrações de dextrose estudadas foram: 150; 300; 500; 1000 e 2000 mg/L e as de atrazina foram: 1; 5; 10 e 15 mg/L. O lodo anaeróbio foi adaptado por um mês ao esgoto sintético. Ácidos graxos voláteis, alcalinidade, atividade metanogênica específica foram investigadas, além da concentração de atrazina. Quatro reatores denominados R-0; R-1; R-2 e R-3 foram operados, sendo R-0 (controle) e R-1 em regime de batelada seqüencial, com tempo de reação de 5 dias e R-2 e R-3 em regime de batelada. R-1 possuía um volume de 4 L, foi mantido com 4 g de massa microbiana/L expressa em sólidos suspensos do licor misto, com esgoto sintético contendo 150 mg dextrose/L e 0,5 mg atrazina/L. No segundo dia 20% dos esgotos

tratados eram substituídos por igual volume de esgoto fresco, e a operação durou por 5 dias até completar o ciclo. O mesmo procedimento se repetiu variando a concentração de dextrose (150 a 2000 mg/L) e a de atrazina (0,5 a 15 mg/L). R-2 foi operado sem fonte externa de carbono, mas com nitrogênio como nitrato e R-3 foi operado sem fonte externa de carbono e nitrogênio, mantendo a mesma concentração de massa microbiana (4 g/L). R-0 sem biomassa para que se pudesse quantificar perda de atrazina por fatores abióticos. O biosistema degradou a atrazina de 43 a 45%, com 5 dias de tempo de reação, com concentração inicial de 0,5 mg/L e com o esgoto contendo 150 mg dextrose/L. Com as demais concentrações de dextrose, não ocorreu mudança significativa na degradação da atrazina. Entretanto, quando a DQO do esgoto foi cerca de 2000 mg/L, a eficiência de remoção diminuiu para 8 a 15%. Nenhum acúmulo de atrazina foi verificado no lodo e nem nos reatores de controle, sendo assim a biodegradação, a única responsável pela remoção de atrazina. A velocidade de degradação de atrazina foi melhor em processo de co-metabolismo (R-1) do que na ausência de fonte externa de carbono (R-2 e R-3). Porém, foi observado que a velocidade de degradação de atrazina foi maior em R-2 do que em R-3. Não houve inibição significativa dos microrganismos, mesmo quando a concentração de atrazina foi de 15 mg/L, e a concentração de atrazina não afetou a produção de gás nem a atividade metanogênica. Contudo, elevado conteúdo orgânico no esgoto sintético reduziu a velocidade de degradação.

4.3 Considerações sobre fungos

Os fungos são considerados biodegradadores eficientes de polímeros de plantas naturais como lignina e celulose, mas também degradam outros tipos de moléculas orgânicas como: ceras, borrachas (BENNET et al. 2002), fenol, benzeno, tolueno, xileno e xenobióticos (PRENAFETA-BOLDÚ, 2002).

Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos, na sua maioria aeróbios, que produzem longos filamentos chamados de hifas cujo conjunto forma uma massa chamada micélio. São componentes significantes da microflora do solo, vivem também nos vegetais e na água. Espalham-se amplamente pela natureza, em consequência da produção de elementos de disseminação – os propágulos, sendo o ar atmosférico uma

das vias de disseminação. Os fungos dispersos pelo ar são chamados de anemófilos e os mais freqüentes das regiões do Brasil pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Helmithosporium* e *Trichoderma* (BITTON, 1994; TRABUSI, 1999).

No processo de respiração dos fungos, em condições aeróbias, a via de hexose monofosfato responde por 30% da glicólise e em condições anaeróbias, a via clássica utilizada pelas leveduras é o ciclo de Krebs, que resulta na formação de piruvato (TRABUSI, 1999).

Os fungos possuem uma estratégia nutricional única, pois suas células secretam enzimas extracelulares, que quebram moléculas grandes, para que possam ser absorvidas. São considerados decompositores primários e secundários dos ciclos clássicos da natureza, sendo a decomposição da lignocelulose, provavelmente, o processo mais simples e mais importante do ciclo do carbono na terra (BENNET et al. 2002).

Os fungos necessitam para seu desenvolvimento, preferencialmente, carboidratos simples como a glicose, entretanto, outras fontes podem ser utilizadas como sacarose, maltose e até mesmo, fontes mais complexas como amido e celulose. Na absorção, de moléculas que apresentam na sua estrutura anel aromático, os fungos a fazem tipicamente por co-metabolismo. Dois sistemas enzimáticos têm sido identificados: citocromo P450 monoxigenase e lignolítico (PRENAFETA-BOLDÚ, 2002).

Citocromo P450 monoxigenase é uma família de enzimas que ocorre em todos os organismos celulares, e participa do metabolismo de xenobióticos. São hemoproteínas, induzidas por numerosas substâncias apolares e requerem NADPH como cofator para atividade catalítica (SCHARF et al. 2000). Reações importantes são conduzidas por este sistema enzimático: adição de oxigênio – hidroxilação por incorporação de um átomo de oxigênio a partir do O₂, ao substrato; redução do átomo de oxigênio com NADPH; epoxidação; peroxidação; desaminação; desalogenação; redução de grupos nitro, azo, N-óxido, peróxido e epóxido; clivagem de ligações C-C. Os substratos para este sistema enzimático, incluem: esteróides, xenobióticos, hidrocarbonetos poliaromáticos, nitrosaminas, ácidos graxos, cetonas, entre outros (GRIFFIN, 1994).

Uma variedade de fungo conhecida como fungos brancos é considerada biorremediadora de substâncias ditas recalcitrantes como herbicidas, inseticidas, antraquinona, hidrocarbonetos poliaromáticos, biocidas, pentaclorofenol, clorofenóis, cloroguaiacóis, cloroligninas, entre outros. Para degradação destes compostos estas

espécies produzem as enzimas oxidativas extracelulares lignina peroxidase, lacase e manganês peroxidase (DÁVILA-VAZQUEZ et al. 2005).

Com relação às condições ambientais, os aspectos físicos que afetam o crescimento são: temperatura, luz, pressão hidrostática e viscosidade (GRIFFIN, 1994). Os fungos crescem abrangendo ampla faixa de temperatura (0 a 62°C) (PELCZAR et al. 1996). Contudo, a faixa ótima para seu desenvolvimento é de 22 a 30°C (PELCZAR et al. 1996). Os fungos toleram grande variação na concentração de íons hidrogênio e, de modo geral, o pH de 5,6 é ótimo para seu desenvolvimento, pois os fungos filamentosos podem crescer em faixa de pH variando de 1,5 a 11 (TRABUSI, 1999).

Os fungos filamentosos têm assumido papel importante e crescente nos processos biotecnológicos, pois são responsáveis por um grande número de metabólitos primários e secundários. O mecanismo de crescimento desses fungos, em meio líquido, pode ser na forma de micélio disperso e *pellets* compactos, sendo o crescimento na forma de micélio disperso, significante apenas em culturas estáticas. Biorreatores agitados lentamente promovem uma condição de crescimento excessivo do micélio, provocando assim problemas operacionais, como diminuição da eficiência devido ao aumento da viscosidade e limitações de transferência de massa (MOREIRA et al. 1996).

Uma das vantagens de se trabalhar com biomassa fúngica é que esta pode ser produzida com baixos custos e de forma relativamente simples por técnicas de fermentação (VIRARAGHAVAN e FU, 2002).

Esta espécie é conhecida, principalmente, por sua habilidade em produzir enzimas e ácidos orgânicos por fermentação (CORAL et al. 2002; EPA, 1997; PAPAGIANNI e MOO-YOUNG, 2002; PASHOVA et al. 1999), especialmente, ácido cítrico (PAPAGIANNI et al. 1999; PAPAGIANNI e MATTEY, 2004). Contudo, muitas pesquisas na área ambiental têm sido desenvolvidas com essa espécie com resultados promissores (FACÓ et al. 2003; GARCIA et al. 2000; GIFFONI, 2000; SÁ, 1997; SAMPAIO et al. 2004; SANTAELLA, 1997,1999; SANTOS et al. 2003; RODRIGUES e SANTAELLA, 2003; RODRIGUES et al. 2004; VASSILEV et al. 1997).

4.4 Estudos sobre o poder de degradação dos fungos

Os fungos dos gêneros *Fusarium*, *Penicilium*, *Epicocum*, *Geotrichum* e *Trichoderma* foram testados por Santaella (1993), em reatores de leito fixo e fluxo

ascendente, com o objetivo de tratar águas naturais com cor elevada devido à presença de substâncias húmicas. Dentre os meios suportes estudados como o carvão ativado e a manta de poliamida, a manta foi escolhida como melhor opção para o reator de fluxo contínuo. A autora concluiu que, com tempo de detenção hidráulica de 20 dias e fonte primária de carbono de 0,5 g/L, 80 % das substâncias húmicas foram removidas por ação fúngica.

Martirani et al. (1995) estudaram a redução do conteúdo fenólico e da toxicidade de efluentes de indústria de produção de azeite de oliva por fungos lignolíticos *Pleurotus ostreatus* e por enzimas do tipo oxidases fenólicas. Micélios de *Pleurotus ostreatus* foram incubados para adaptação com o efluente em placas contendo: 15 g/L, de ágar; 2,5 g/L, de dextrose batata; 0,5 g/L, de extrato de amido; 10 g/L, de maltose e efluente em concentrações de até 20%. Logo após ser inoculado por cinco dias em 250 mL de solução com a mesma constituição da anterior, o micélio adaptado foi removido, filtrado e transferido para 10 amostras de efluente diluídas em até 20% sem a adição de nutrientes, por 100 h. Para os testes com a enzima, foi preparado um extrato seco com fenol extraído do próprio efluente, o qual foi suspenso em 25 mL de uma solução de acetato de etila. Após esse procedimento, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL desta solução, e misturada com 0,5 mL de solução tampão de fosfato a pH 6 e à enzima. Os resultados demonstraram que esta espécie removeu 90% dos fenóis do efluente diluído mesmo na ausência de nutrientes e em curto período de tempo (100 h). Já a enzima oxidase fenólica sozinha, apresentou diminuições significantes do conteúdo fenólico, mas não desintoxicou efetivamente o efluente. Isto ocorre, segundo os pesquisadores, porque alguns dos produtos da oxidação enzimática fenólica (por exemplo, radicais fenólicos) são mais tóxicos que os compostos fenólicos originais.

Sá (1997), em escala laboratorial, analisou o poder de degradação das espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Drechslera sp*, na água residuária de uma indústria de laticínio, em duas etapas: operação em batelada e operação em fluxo contínuo, utilizando um reator de leito fixo e fluxo ascendente. A autora quando comparou as duas operações concluiu que o processo contínuo para tratamento do efluente da indústria de laticínio foi a melhor opção. O experimento mostrou remoção de 69 % de compostos causadores de DQO para o reator em batelada, com aumento de amônia e ortofosfato e redução dos níveis de sulfato, nitrito e nitrato. O reator de fluxo contínuo apresentou reduções dos compostos causadores de DQO de 82%, 84%, 81%, 74%, e 49% para os TDH de 31, 21, 11, 5 e 2 horas. Óleos e graxas foram removidos

com eficiência de 90% no TDH de 5 horas. Neste estudo não foi verificada remoção sistemática dos nutrientes: nitrito, nitrato e ortofosfato, e sim uma tendência à síntese de amônia.

Masaphy et al. (1997) estudaram o processo de N-desetilação da atrazina com extrato de células livres de *Pleurotus pulmonaris* in vitro induzido por Mn^{2+} . Esta espécie desalquila atrazina produzindo desetilatrizona (CAIT), de-propilatrazina e desetilpropilatrazina. *P. Pulmonaris* foi incubado em meio líquido com dextrose-batata com e sem manganês, sob agitação, a 28° C. Após crescimento da espécie as células foram extraídas por filtração. Para o ensaio de transformação de atrazina em CAIT foi utilizada uma mistura constituída por: extrato de células do fungo, solução tampão fosfato (pH 6) e atrazina na concentração de 116 μ M, a qual foi incubada por 7 h sob agitação, a 28° C. A produção de CAIT só ocorreu com o extrato de célula do fungo que foi incubado com manganês, comprovando assim a necessidade deste íon para indução de sistemas enzimáticos capazes de promover a transformação de atrazina em CAIT.

Vassilev et al. (1997) tinham como objetivo avaliar o emprego de *Aspergillus niger*, imobilizado em espuma de poliuretano, para tratar efluente de indústria de extração de óleo de oliva (OMW). O experimento foi realizado em batelada (cinco para cada meio) e três meios distintos com o efluente da indústria, foram estudados: OMW+N (meio com esgoto e sulfato de amônio), OMW + N + P (meio com esgoto, sulfato de amônio e fosfato) e OMW + P (meio com esgoto e fosfato). A imobilização da espécie foi feita em meio a base de glicose contendo cubos de espuma de poliuretano e 3 x 10⁶ esporos de *Aspergillus niger*/mL. Após a germinação dos esporos, os cubos de poliuretano foram lavados e adicionados aos três tipos de meio para o processo de fermentação Tanto a imobilização quanto a fermentação foram conduzidas a 30°C sob 200 rpm. Os autores verificaram que nos reatores com OMW + N + P ocorreu maior produção de biomassa, como também melhor remoção de fenol – cerca de 61%. Segundo os autores, a remoção de fenol está diretamente relacionada com a maior produção de biomassa. Os pesquisadores concluíram que a presença de N e P no meio estimulou o crescimento do fungo, diminuiu a produção de ácido e promoveu melhor remoção de fenol.

O fungo *Lentinula edodes* imobilizado em material de poliuretano teve sua performance avaliada por D'Annibale et al. (1998), com relação à biodegradação de água residuária oriunda da produção de óleo de oliva; água esta de extremo poder poluente, bem como de alta toxicidade devido à presença de compostos fenólicos. O

experimento foi realizado em três ciclos de batelada com 300 ml do efluente, temperatura de 30°C e tempo de detenção de oito dias para cada batelada. A remoção de carbono orgânico total foi de 73%, 88% e 75% nas três bateladas, e de fenol de 83,5%, 88,5% e 78,0%. Observou-se também remoção de cor do efluente. Não há correlação entre a descoloração do efluente e a produção da enzima manganês peroxidase pela espécie fúngica estudada. Vinciguerra et al. (1995) também, utilizaram a espécie fúngica *Lentinus edodes* para reduzir as características poluidoras de efluentes de indústria de produção de azeite de oliva, utilizando um processo não otimizado (baixas concentrações de co-substrato e ausência de ar ou oxigênio) a fim de simplificar o tratamento e diminuir a produção de biomassa fúngica. O inóculo foi obtido pela permanência dos fungos em placa de Petri com meio de cultura Agar Dextrose Batata por 1 semana a 28°C. Após este período, o inóculo foi transferido para erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de um meio com a seguinte composição: 5 g/L, de glicose e 2 g/L, de extrato de fermento (DIFCO). O pH do meio foi tamponado em 5,5 com KH_2PO_4 e K_2HPO_4 . Após 4 dias de incubação o meio foi homogeneizado. Para os testes, foi preparada uma solução do mesmo meio, na qual foi adicionado o efluente diluído previamente esterilizado e centrifugado e 5% da solução homogeneizada do inóculo. As amostras foram incubadas a 30°C, sob agitação de 140 rpm por 12 dias. Em 4 dias foram obtidos 75% de redução de carbono orgânico total, 66% de redução de fenóis totais e 45% de descoloração.

Melaço é um dos sub-produtos mais importantes formados na produção de etanol. É um poluente potencial das águas, por colorir rios e reduzir a oxigenação das águas, chegando a possuir DQO de 90000 mg/L. Fitz Gibbon et al. (1998) estudaram o efeito do ácido gálico, do ácido vanílico e do melaço na biorremediação de água residuária de destilaria por ação dos fungos *Geotrichum candidum*, *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Mycélia sterilia*. Foram preparadas Placas de Petri com meio de cultura Saboraud (pH 5) contendo os ácidos gálico e vanílico (concentração final de 100 mM) e com o melaço (0 a 100% v/v) para realização do experimento. Todas as placas foram inoculadas com discos de 5 mm de cada fungo no ágar. As placas inoculadas foram incubadas em temperatura de 30 a 37°C por 5 dias. Os resultados mostraram que todos os fungos estudados tiveram seu crescimento inibido pela presença do ácido gálico e do ácido vanílico, exceto a espécie *Geotrichum candidum*. Esta espécie e a espécie *Phanerochaete chrysosporium* tiveram sua taxa de crescimento aumentada por aumento da concentração de melaço (acima de 50% v/v) e apresentaram

remoção de 53% de cor depois de 10 dias de incubação. Entretanto, *Coriolus versicolor* e *Mycelia sterilia* foram inibidos quando a concentração de melão ficou em torno de 5% (v/v).

Knapp e Newby (1999) estudaram a utilização de fungos brancos da madeira para tratar efluente da indústria química contendo um diazo altamente colorido (nitrated stilbene sulfhonic acid). Os fungos foram cultivados em meio com extrato de malte por 7 dias a 27°C. Depois desse período o meio foi assepticamente removido e substituído por um meio limitado de nitrogênio, contendo o efluente apropriadamente diluído. A descoloração do efluente foi avaliada por monitoramento da absorbância a 390 nm. As amostras de efluente foram diluídas em tampão de fosfato de sódio para ficarem com essa absorbância. Doze espécies fúngicas testadas reduziram a coloração do efluente em mais de 80% com 14 a 18 dias de incubação. Entretanto, com 3 a 4 dias se alcançou redução da cor em torno de 60% a 70%. Os autores avaliaram que a descoloração foi um processo degradativo, visto que pouca cor ficou absorvida no micélio fúngico. Porém, a habilidade de reduzir a coloração com mínima produção de pigmento vermelho ficou restrita a quatro espécies: *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Piptoporus betulinus* e *Pleurotus ostreatus*. Os resultados obtidos com estas quatro espécies mostraram que *Phanerochaete chrysosporium* e *Coriolus versicolor*, reduziram o pH do meio tampão de 7,8 para 4,0 a 4,4; *Pleurotus ostreatus* reduziu para 5,5 a 6,0 e *Piptoporus betulinus* reduziu para 2,0 a 2,2. O manganês (Mn^{2+}), conhecido por ser capaz de regular a atividade de enzimas lignolíticas produzidas pelos fungos, foi adicionado ao meio em concentrações de 5, 10, 20 e 40 mg/L, a fim de se verificar que influência teria no processo de remoção de cor pelos fungos. Concluíram que nenhuma das quatro espécies testadas reduziu a cor devido à presença de Mn^{2+} . O estudo permitiu concluir que os fungos brancos da madeira são promissores no processo de descoloração de águas residuárias concentradas da indústria química.

O efluente resultante do branqueamento do algodão possui cor semelhante ao efluente da indústria de papel. A remoção da cor deste efluente é muito difícil em sistemas convencionais de tratamento de esgoto. Zhang, Knapp e Tapley (1999) estudaram a descoloração do efluente do processo de branqueamento do algodão empregando fungos brancos da madeira, onde a atividade de descolorir foi ideal na temperatura de 27°C, concentração de glicose de 5 g/L, pH de aproximadamente 5, mas a descoloração também foi muito boa em pH 4, e período de 3 a 4 dias de incubação. Os resultados mostraram remoção de 70% de cor, porém, apenas uma pequena parte da

DQO foi removida. O estudo também mostrou que foi necessária glicose como fonte de carbono para manter a atividade da enzima manganês-peroxidase no processo de descoloração, entretanto a adição de NH_4^+ inibe este processo.

Kauffmann et al. (1999) reportaram a remoção de fenóis de água residuária sintética com uso peroxidase da espécie fúngica *Coprinus cinereus* e H_2O_2 . Fenóis, H_2O_2 e a enzima da espécie fúngica foram misturados em 10 mM de solução tampão de fosfato para produzir uma solução de fenol de 0,1 mg/mL, 1 mM de H_2O_2 e 1 U ml^{-1} da enzima. A mistura foi incubada em frascos erlenmeyers por 3 h a 25°C sem a presença de luz. O precipitado formado foi removido por centrifugação, sendo o sobrenadante analisado com relação a fenóis. Os pesquisadores verificaram que em pH neutro e aumentando a concentração de H_2O_2 de 1 para 1,5 mM a remoção de fenóis atingiu 99%.

Kim e Shoda (1999) estudaram simultaneamente a descoloração do melão e do corante antraquinona pela espécie fúngica *Geotrichum candidum*. A espécie foi cultivada em meio ágar dextrose fosfato por 6 dias a 30°C. O melão utilizado possuía aproximadamente 33% de sacarose, 6,5% de glicose, 7,5% de frutose e 0,57 g/kg, de nitrogênio Kjeldahl e foi diluído para 40 a 50 g/L. Nesta diluição foram adicionados 20 g/L, de glicose; 0,5 g/L, de tartarato de antimônio; 1 g/L, de hidrogeno fosfato de potássio e 0,5 g/L, de sulfato de magnésio heptahidratado. Foram misturados a 120 rpm e 30°C 5ml da suspensão de esporos, cerca de 10^7 unidades formadoras de colônia, com 150 ml de meio melão a fim de se verificar o processo de descoloração. O grau de descoloração do melão foi de 87% com 12 dias de incubação e a taxa máxima de descoloração do corante na cultura bruta foi obtida com 7 dias.

Robles et al. (2000) tiveram com seu estudo o propósito de avaliar a capacidade de sete tipos de fungos da espécie *Penicillium* ssp. (P1, P2 P3, P4, P5, P6 e P7), isolados de lagoas de disposição de efluentes de indústria de produção de azeite de oliva, na redução de carga orgânica e do conteúdo fenólico destes efluentes, tendo sido avaliada também a capacidade de crescimento das espécies. A obtenção dos esporos foi realizada pelo cultivo das espécies, a 28°C, em um meio contendo: 5 g/L, de peptona; 3 g/L, de extrato de malte; 3 g/L, de extrato de amido; 10 g/L, de glicose e 17 g/L, de agar. Em seguida, frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL do efluente foram inoculados com 1 mL de esporos em solução salina estéril, de forma a obter uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ esporos/mL. Os ensaios foram realizados em mesa agitadora, sob rotação de 120 rpm. Os pesquisadores observaram que todas as espécies cresceram efetivamente

no meio em questão, formando uma película que cobria a superfície do líquido. Contudo, o melhor resultado foi obtido com a espécie P4 que forneceu 21,50 g (peso seco) de biomassa por litro de água residuária não diluída após 20 dias de incubação. Esta espécie também apresentou melhor redução da carga orgânica (60,75%) e do conteúdo fenólico do meio (54,50%). Ocorreu elevação do pH, em relação ao inicial com todas as espécies estudadas, ficando a variação entre 6,22 e 7,62.

Garcia et al. (2000) estudaram a remoção de compostos fenólicos presentes em efluentes de indústria de óleo de oliva, empregando os fungos *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum*. Inicialmente, estes fungos foram colocados para crescer em meio sintético por 48 h, com 40 g glicose/L, 5 g de peptona de caseína/L, 5 g de peptona de malte/L e pH ajustado em 7,3. Em seguida as espécies fúngicas foram adaptadas ao efluente por 48 h, a 26°C sob agitação de 200 rpm. O processo de fermentação entre o efluente e cada fungo, foi realizado em reator de 5 L, sob agitação de 500 rpm, pH ajustado entre 4,5 e 6,5 a 26°C em condições estéreis. As variáveis investigadas foram DQO, SSV, concentração de fenóis e de orto-difenol. A espécie *Phanerochaete chrysosporium* removeu 75% de DQO, 90% de fenóis totais e 100% de orto-difenol. *Aspergillus niger* removeu 73% de DQO, 76% de fenóis totais e 82% de orto-difenol. *Aspergillus terreus* removeu 63% de DQO, 64% de fenóis totais e 76% de orto-difenol. *Geotrichum candidum* não promoveu remoção de fenóis totais nem de orto-difenol, mas a remoção de DQO foi de 46%. Com relação a SSV o percentual de remoção foi de 60%, 53%, 66% e 55% para *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Geotrichum candidum*, respectivamente. As fermentações seguiram o modelo de Monod e as constantes cinéticas determinadas foram $\mu_{\text{máx}}$ igual a 0,06; 0,09 e 0,09 h⁻¹ para *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*, respectivamente e Ks (DQO) de 4000 mg/L; 18000 mg/L e 1200 mg/L para *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus*, respectivamente. A taxa de crescimento celular ($Y_{x/s \text{ DQO}}$) foi de 0,31 mg/mg; 0,26 mg/mg e 0,49 mg/mg, respectivamente. A relação de fenóis removido por mg de microrganismo gerado (E_{FX}) foi de 0,055 para *Phanerochaete chrysosporium*; 0,061 para *Aspergillus niger* e 0,031 para *Aspergillus terreus*. Os autores concluíram que a melhor resposta encontrada em relação á remoção de fenóis e ao crescimento celular seguiram a seguinte ordem: *Phanerochaete chrysosporium* > *Aspergillus niger* > *Aspergillus terreus*.

Giffoni (2000) estudou, em escala laboratorial, quatro reatores biológicos de leito fixo e fluxo ascendente, tendo manta agulhada de poliamida como meio suporte, para o tratamento de água residuária sintética de laticínios. O processo foi contínuo e os TDH testados foram 2,5 e 5 h. Dois dos reatores foram inoculados com fungos e tiveram seus afluentes acidificados, com o intuito de minimizar a proliferação bacteriana. Outro foi misto com fungos e bactérias e no quarto reator buscou-se condição anaeróbia. Os parâmetros utilizados para avaliar o desempenho dos reatores foram: sólidos totais, sólidos totais fixos, sólidos totais voláteis, DQO, pH, nitrato, nitrito, fósforo total e amônia. Os melhores resultados foram conseguidos com os reatores com fungos com eficiência de remoção de 68% para DQO e 62% para nitrogênio inorgânico no TDH de 2,5 h. Para o TDH de 5 h a remoção de DQO foi de 61%. O reator misto obteve aproximadamente 80% de remoção de nitrogênio inorgânico com 5 h de detenção hidráulica. Nenhum dos reatores apresentou remoções consideráveis dos nutrientes fósforo total e sulfato.

Rao e Viraraghavan (2002) investigaram o uso de células de *Aspergillus niger* para remoção de fenóis de soluções aquosas em concentrações de 1000 µg/L. A espécie foi inoculada em um meio contendo dextrose (20 g/L); peptona (10 g/L) e extrato de levedura (3 g/L) em água deionizada. O meio foi mantido em temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, e após 2 dias, foi observado o crescimento dos fungos. Após um período de crescimento de quatro dias, a biomassa foi filtrada em peneiras de 150 µm e lavada com água deionizada. Para os experimentos, foram preparados cinco frascos erlenmeyers diferentes, nos quais procurou-se fazer um estudo da influência do pH na remoção dos fenóis. Os valores de pH foram ajustados inicialmente a 2, 4, 6, 8 e 10, em cada frasco, separadamente. A dosagem da biomassa nos frascos foi de 0,2 g/L e o pH era ajustado com ácido sulfúrico 0.5 M ou hidróxido de sódio 1 M. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora a 125 rpm, e eram retirados em intervalos de tempo determinados (30 horas). A remoção máxima de fenol foi observada em pH 5,1 com a biomassa tratada com ácido sulfúrico (aproximadamente 66% de fenol removido em uma solução de concentração inicial de 1000 µg/L).

Prenafeta-Boldú (2002) estudaram o isolamento e crescimento de fungos em hidrocarbonetos aromáticos voláteis utilizando tolueno como única fonte de carbono e energia. Três técnicas de enriquecimento foram utilizadas: cultura em meio sólido, em meio líquido e biofiltro de ar. As fontes de inóculo foram: solos poluídos com BTEX

(benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno); solo de posto de gasolina e água contaminada com BTEX. Cinco espécies de fungo foram selecionadas: *Ladophialophora* sp MYA – 2335 (T1), *Ladophialophora* sp MYA – 2336 (T2), *Pseudeurotium zonatum* MYA – 2337 (T3), *Exophiala* sp (T4) e *Leptodontidium* sp (T5). Para verificar o crescimento das espécies em meio com tolueno, foi empregada uma cultura submersa estática, e entre 5 e 10 dias houve completa depleção do tolueno.

Aggelis et al. (2002) observaram o crescimento de oito espécies de fungos brancos (*Abortiporus biennis*, *Dichomitus squalens*, *Inonotus hispidus*, *Irpex lacteus*, *Lentinus tigrinus*, *Panellus stipticus*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes hirsuta*) em efluentes de indústria de produção de azeite de oliva, durante um mês. Objetivava-se a comparação da atividade enzimática relativa das espécies, bem como a capacidade da redução dos compostos fenólicos e da descoloração do efluente. Antes do tratamento biológico, a água residuária era diluída a 50% com água destilada, ajustada a pH 6 com H₃PO₄ (85% v/v), centrifugada por 5 minutos e esterilizada (121°C, 1,2 atm, 20 min). Os fungos foram incubados em meio de cultura sólido constituído por agar (1,6% peso/volume) e água residuária. Logo após, foram removidos e serviram como inóculo para meio de cultura líquido, constituído de agar e 100 mL de água residuária. Após um mês, em intervalos de tempo regulares, os frascos eram desmontados, o micélio removido, filtrado a vácuo, seco (80°C) e pesado. Todas as espécies estudadas apresentaram bom crescimento, sendo que a espécie *Pleurotus ostreatus* apresentou maior produção de biomassa (94.1 ± 4.2 mg/L em um mês). Os pesquisadores observaram que os compostos fenólicos foram eficientemente reduzidos por: *Pleurotus ostreatus* (52%) e *Abortiporus biennis* (55%), seguidas por *Panellus stipticus* (42%) e *Dichomitus squalens* (36%), mas somente *Pleurotus ostreatus* obteve boa eficiência de descoloração do efluente (49%).

A pesquisa realizada por Bending et al. (2002), tinha como objetivo avaliar a habilidade de fungos brancos em degradar pesticidas monoaromáticos através de seu sistema enzimático lignolítico. Os pesticidas empregados foram metalaxil, atrazina, terbutilazina e diuron na concentração de 10 mg/L. Todos foram incubados em placas de Petri com meio nutriente e inoculados com culturas fúngicas por 42 dias. Passado esse período, foi preparado um meio líquido com o material das placas para quantificação dos pesticidas por cromatografia líquida. Dentre as espécies fúngicas estudadas, *Coriolus versicolor* degradou 56% de metalaxil e *Stereum hirsutum* degradou apenas 35%, *Phanerochaeta velutina* e *Pleurotus ostreatus* foram capazes de degradar

apenas 10% do metalaxil, enquanto *Flammulina velupites* não mostrou nenhum percentual de degradação. *Hypholoma fasciculare* e *Stereum hirsutum* foram capazes de degradar 88% de terbutilazina e *Coriolus versicolor* degradou 86,2% de atrazina e degradou quase completamente o diuron. *Hypholoma fasciculare*, *Stereum hirsutum* e *Agrocybe semiobicularis* foram degradadores efetivos de diuron alcançando percentuais de 80%. Os autores concluíram que os fungos brancos possuem capacidade de degradar diferentes grupos de pesticidas, apesar de não conhecerem claramente os mecanismos envolvidos, mas acreditam que estejam relacionados com o potencial lignolítico.

Em 2002, Blázquez et al., investigaram a capacidade de degradação e descoloração do efluente de indústria de produção de azeite de oliva, utilizando a espécie fúngica *Phanerochaete flavido-alba*. A descoloração obtida foi de 70%, enquanto a redução da toxicidade do efluente foi superior a esta taxa ($70,2 \pm 3,1\%$). Segundo os pesquisadores, é possível trabalhar com a espécie estudada em reatores biológicos de escala industrial, dada a capacidade desta em reduzir os compostos fenólicos presentes neste efluente.

Kapdan e Kargi (2002) empregaram a espécie fúngica *Coriolus versicolor*, para descoloração do corante têxtil “Everzol Turquoise Blue G”, ftalocianina, em reator biológico de contato com rotação (Biodiscos). Parâmetros de operação como: tipo de disco empregado como meio suporte, velocidade rotacional (10 a 40 rpm), concentração de glicose (5 a 10 g/L) e concentração de corante (50 a 500 mg/L) foram considerados. O reator foi operado em batelada com tempo de reação de 48 h, temperatura de 28° C e pH entre 4,5 e 5,0. O sistema foi monitorado através das determinações de carbono orgânico total (COT), concentração de glicose e concentração de corante. A concentração de glicose teve forte efeito na descoloração do corante pelo fungo *Coriolus versicolor*. O fungo quando foi cultivado na concentração de 10 g/L, de glicose, resultou em melhor crescimento e em maior eficiência de descoloração, quando comparada com a eficiência obtida com 5 g/L. O estudo revelou que a diminuição na concentração de glicose para 2 g/L causou crescimento insuficiente e perda da atividade fúngica, levando ao decréscimo na eficiência de remoção de cor. Com relação ao efeito da velocidade rotacional, encontrou-se melhor remoção entre 30 e 40 rpm (75%), enquanto que entre 10 e 20 rpm a remoção de cor foi de apenas 35%. A velocidade rotacional também teve influência sobre a remoção de COT, cujas remoções foram de 65% e 80% para 20 e 40 rpm, respectivamente. Concentrações de corante entre 50 e

200 mg/L, proporcionaram percentual de descoloração da água de aproximadamente 80% que diminuiu para 33% com concentração de 500 mg/L, de corante.

A habilidade de espécies *Pleurotus spp.* para degradação de compostos fenólicos presentes em efluentes de indústria de produção de azeite de oliva foi estudada por Tsioulpas et al. (2002). Os pesquisadores visaram, em particular, a atividade da enzima oxidase fenólica (lacase) destas espécies. A fim de determinar a concentração máxima do efluente na qual o crescimento das espécies não era afetado, foram realizados ensaios em placas, contendo: as espécies previamente cultivadas, 10 mL de solução estéril do efluente diluído (10%, 25%, 50%, 75% e 100% (v/v)) e 10% (v/v) de ágar. A densidade de micélio, estimada qualitativamente, foi mais elevada na placa com diluição de 75%. Observou-se, nesta mesma diluição, descoloração progressiva do meio, bem como maior atividade de enzima lacase. Os demais ensaios foram realizados a 110 rpm em mesa agitadora, em frascos cônicos de 250 mL contendo: 50 mL do efluente esterilizado e diluído a 75% e 10 discos de 6 mm de diâmetro previamente colonizados uniformemente pelas espécies. Com a pesquisa, concluíram que a espécie tem capacidade para crescer e remover fenóis do efluente mesmo sem adição de nutrientes. Com diluição de 75% o crescimento da espécie foi acompanhado de uma elevada atividade da enzima lacase, responsável pela degradação fenólica que ficou entre 69 e 76%. A menor concentração de fenol e a mais significativa descoloração do efluente foi atingida após um período de 12 a 15 dias.

O principal objetivo da pesquisa realizada por Bollag et al. (2003) foi investigar a transformação enzimática de clorofenóis pela espécie fúngica *Trametes vilosa*. Os clorofenóis utilizados no estudo foram: 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol e 2, 4, 6-triclorofenol, em soluções aquosas de concentração 0,5 mM. As soluções, em triplicada, foram incubadas a 25°C por 24 h com a enzima lacase das espécies fúngicas (2 ou 4 unidades de enzima ativa) em 10,0 mL de solução tampão 0,2 mM de fosfato a pH 7. Experimentos com diferentes concentrações do substrato (0,1 a 1 mM), em misturas binárias e terciárias, foram também realizados. Os resultados demonstraram que enzimas, como a lacase, são capazes de oxidar clorofenóis isolados ou em mistura, embora tenha ocorrido uma ligeira redução na atividade catalítica se mais de um clorofenol estivesse presente.

Volke-Sepulveda et al. (2003) avaliaram a biodegradação de hexadecano por *Aspergillus niger* através de fermentação em meio de cultura líquido e em meio de cultura sólido. Foram testadas, no meio líquido, concentrações de hexadecano de 45, 90,

135 e 180 g/L e no meio sólido, concentrações de 20, 40, 60 e 80 g/L. Verificaram que o crescimento de *A. niger* foi consideravelmente maior em meio sólido do que em meio líquido e o consumo de hexadecano, também, foi maior em meio sólido. Contudo, o maior consumo (100 %) foi obtido com a menor concentração de hexadecano (45 g/L), em 31 dias de cultura. Segundo os autores um suplemento de nitrogênio e fósforo teria favorecido resultados similares para as maiores concentrações de hexadecano estudadas. Ainda segundo os autores, a razão para a mineralização incompleta do hexadecano no meio, pode ter sido a limitação de oxigênio. A velocidade máxima de produção de biomassa, também foi maior (39 vezes) no meio sólido. Concluindo, dessa forma, que a degradação de hexadecano por fungos foi melhor quando estes foram cultivados em meio sólido.

Dias et al (2003) avaliaram o desempenho de um sistema enzimático não lignolítico, claramente dominado por atividade de lacase, secretado por fungos mesofílicos brancos (denominado Euc-1) durante a biodegradação de efluentes. Os autores compararam a taxa de descoloração e de degradação de compostos fenólicos do efluente por estes fungos, com o da espécie *Phanerochaete chrysosporium*, uma espécie tipicamente lignolítica pouco produtora de lacase. Foram preparadas culturas sólidas constituídas de dois diferentes tipos de meio: um contendo ágar (15% p/v) e um outro rico em nutrientes com 3,9% p/v de ágar dextrose batata. Os experimentos foram feitos em triplicada, tendo sido usados em cada um 15 mL do efluente em diluições de 20%, 40%, 60% e 80%. A incubação foi realizada a 35°C para *Phanerochaete chrysosporium* e a 28°C para Euc-1. O crescimento e a descoloração foram periodicamente analisados por inspeção visual. Na diluição de 20% ocorreu a melhor descoloração, e portanto esta foi escolhida para os ensaios subseqüentes. A massa fúngica cultivada foi inoculada a 28°C, por 24 dias, em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de um meio com a seguinte constituição: efluente (20% de diluição), 10 g/L, de glicose; 2,2 g/L, de tartarato de amônia; 1,0 g/L, de KH_2PO_4 ; 0,26 g/L, de NaH_2PO_4 ; 0,5 g/L, de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,9 g/L, de ácido 2,2-dimetilsucínico; 1,0 mg/L, de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 74,0 mg/L, de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 6,0 mg/L, de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 mg/L, de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 mg/L, de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 1,0 mg/L, de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 mL de solução de vitaminas. O meio foi ajustado em pH 4,5 com NaOH 2 M. O sistema enzimático excretado por Euc-1 apresentou melhor descoloração do efluente que a espécie *Phanerochaete chrysosporium*, cuja principal enzima é a lignina peroxidase, e removeu 90% de fenóis, 73% de cor e 45% de DQO. Além disso, segundo os autores as

enzimas peroxidases requerem peróxido de hidrogênio como substrato, que é relativamente caro, sendo esta uma desvantagem em relação às lacases.

Em sua pesquisa, Oliveira et al. (2004) objetivavam encontrar fungos capazes de degradar fenóis presentes em efluentes de refinarias de petróleo com espécies presentes neste mesmo meio. Para a seleção das espécies, foi realizada uma caracterização microbiológica do efluente da refinaria Lubrificantes e Derivados de Petróleo do Nordeste (LUBNOR)/Petrobrás-CE. Os fungos presentes foram então identificados e produzidos em larga escala a fim de serem utilizados em reatores. Na pesquisa, foi utilizado um efluente sintético com as características semelhantes às do efluente final da indústria. Tal efluente possuía a seguinte composição: KH_2PO_4 (400 mg/L); K_2HPO_4 (400 mg/L); MgSO_4 (400 g/L); NaCl (300 mg/L); CaCl_2 (50 mg/L); Sacarose (1000 mg/L) e fenol (50 mg/L). Dezoito frascos de vidro com capacidade para 3 L foram usados como reatores. Foram montados lotes de dois reatores, um que recebia 1,5 L de efluente sintético e 25 mL de meio de cultura, e outro que recebia apenas o efluente sintético e servia como controle. Os reatores foram operados em nove tempos de desmonte (1, 2, 3, 6, 11, 15, 20, 26 e 34 dias), após os quais um par de reatores era desmontado para a determinação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos. O resultado da caracterização microbiológica do efluente industrial mostrou que a espécie presente no tanque de equalização da empresa pertencia ao gênero *Candida*. No entanto, segundo os pesquisadores, outras espécies poderiam ter sido isoladas, caso ocorressem algumas modificações nas condições de cultivo. Em somente dois dias, a taxa de degradação de fenóis atingiu valores acima de 0,17 mg de fenol/CFU(unidade formadora de colônia fúngica).dia. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que há, no efluente estudado, fungos capazes de remover fenóis presentes em águas residuárias.

Sampaio et al. (2004) estudaram em escala laboratorial, um sistema contínuo constituído por um reator de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB), seguido por um reator biológico com fungos (RBF), para tratamento de água residuária de uma indústria de beneficiamento de castanha de caju. O sistema contínuo foi alimentado por um período de 60 dias, e teve como objetivo verificar seu desempenho na remoção de compostos causadores de DQO, nitrato, amônia e ortofosfato. O reator UASB apresentou eficiência média de remoção de DQO de 72%; 68% e 68% para os tempos de detenção hidráulica (TDH) de 12 h; 10 h e 8 h, respectivamente. Com relação aos SST, a remoção média foi de aproximadamente 78% para os TDH de 12 e 10 h e de 74% para 8 h de tempo de detenção hidráulica. O RBF mostrou-se viável ao pós-

tratamento do efluente do reator UASB, removendo compostos causadores de DQO com eficiências de 84%; 74% e 61% para os TDH de 4 h; 2 h e 1 h, respectivamente. O sistema UASB-RBF teve como melhor remoção de DQO, um percentual de 95 % para 14 h de tempo de detenção hidráulica, sendo 10 h no reator UASB e 4 h no RBF. A remoção de nitrato foi eficiente, porém houve pouca eficiência na remoção de amônia e ortofosfato, devido a oscilações entre síntese e remoção ocorridas nos reatores.

Denizli et al. (2004) estudaram o uso fungo *Phanerochaete chrysosporium* para remoção de fenóis e clorofenóis (o-clorofenol, p-clorofenol e 2,4,6 triclorofenol) de soluções aquosas. Na pesquisa, foram verificados os efeitos das concentrações iniciais de fenóis e clorofenóis e do pH, na taxa e capacidade de adsorção desses compostos pela espécie fúngica. Com este propósito, soluções de fenóis e clorofenóis com várias concentrações (variando de 25 a 1000 mg/L), foram tratadas com a biomassa (50 mg) em diferentes valores de pH (2,0 a 8,0). Com os resultados, verificou-se que a adsorção dos poluentes nas paredes do micélio fúngico foi claramente dependente do pH, aumentando quando ocorre aumento do pH. A dessorção de fenol e clorofenóis foi realizada usando solução de metanol (30% (v/v)). Através dos experimentos, os autores observaram que a espécie *Phanerochaete chrysosporium* pôde ser reutilizado por mais de dez ciclos sem perdas na capacidade de adsorção dos compostos fenólicos.

Em outra pesquisa, Denizli et al. (2005) investigaram o potencial do uso do fungo *Pleurotus sajor caju* para remoção de fenóis (fenol, o-clorofenol, p-clorofenol e 2,4,6- triclorofenol) de soluções aquosas. Foram estudados os efeitos das concentrações iniciais das soluções de fenóis e clorofenóis, que variaram entre 25 e 1000 g/L, e do pH do meio na taxa de adsorção dos poluentes pela espécie fúngica, tendo este último variado de 2,0 a 8,0, com adição de HCl ou NaOH. Os frascos contendo as soluções sintéticas (250 mL) e a biomassa fúngica (50 mg por frasco), foram agitados a 600 rpm em temperatura ambiente. As adsorções máximas de fenóis e clorofenóis pelo fungo *Pleurotus sajor caju* foram: 0,95 mmol/g para fenol, 1,24 mmol/g para o-clorofenol, 1,47 mmol/g para p-clorofenol e 1.89 mmol/g para 2,4,6- triclorofenol. A ordem de afinidade dos poluentes pela espécie foram: 2,4,6-triclorofenol > p-clorofenol > o-clorofenol > fenol. A adsorção destes compostos pelo micélio do fungo foi claramente dependente do pH aumentando com a elevação deste parâmetro. Nesta pesquisa, a espécie *Pleurotus sajor caju* foi reutilizada por mais de cinco ciclos sem perdas na capacidade de adsorção.

Rodrigues et al. (2004) avaliaram a redução da concentração de fenol pelo uso de fungos em reatores em batelada e a influência da adição de glicose como fonte primária de carbono na eficiência do processo. A água residuária foi preparada em laboratório com a seguinte composição 0,25 g/L, de fenol; 2,00 g/L, de sulfato de amônia (NH_4SO_4); 1,00 g/L, de nitrato de sódio (NaNO_3); 0,20 g/L, de fosfato dihidrogeno de potássio (KH_2PO_4); 0,01 g/L, de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,25 g/L, de sulfato de magnésio (MgSO_4) e 1 mL de solução de elementos traço preparada com 0,08 g/L, de sulfato de cobre hexahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 0,05 g/L, de ácido molibídico (H_2MoO_4); 0,043 g/L, de sulfato de zinco (ZnSO_4) e 0,05 g/L, de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, diluídos em 1L de água destilada. O pH do meio foi reduzido de 6,35 para 4,80 pela adição de ácido sulfúrico (5 N) para deixar o meio mais adequado ao desenvolvimento pleno dos fungos. Cinquenta e quatro recipientes cilíndricos de vidro, com volume de 1,5 L, foram vedados com tampa plástica e empregados como reatores, os quais foram divididos em seis lotes. Cada reator recebeu 1,2 L de água residuária contendo fenol. *Aspergillus niger* foi empregado como inóculo dos reatores embora ao final do experimento tenha se constatado a presença de *Fusarium* sp. e de leveduras. Cada lote possuía 9 reatores, sendo 3 de controle (RC), 3 com inóculo de *Aspergillus niger* (RF) e 3 com inóculo de *Aspergillus niger* e adição de glicose (RFG) na concentração 500 mg/L. Ao longo da batelada foram realizadas análises de fenol, sólidos suspensos voláteis (SSV), pH, oxigênio dissolvido e temperatura. Dados obtidos no experimento mostraram que os fungos degradaram fenol tanto nos reatores que receberam adição de glicose, como nos que não possuíam fonte primária de carbono. Verificou-se redução de 57% e 69%, respectivamente, para os reatores RFG e RF. No final do experimento, os reatores desprovidos de glicose e os que receberam este composto, apresentaram remoções semelhantes de fenol, de modo que o poluente atingiu concentração menor que 1,00 mg/L no 18º dia de experimento.

Dávila-Vasquez et al. (2005) estudaram a transformação de pesticidas halogenados empregando a enzima peroxidase produzida a partir do fungo *Bjerkandera adusta*. O ensaio enzimático para transformação dos pesticidas halogenados: bromoxinil, dicamba, diclorofenol, ditoterb, diuron, propanil, niclosamida, pentaclorofenol e diclorofention foram realizados em tubos de vidro de 4 mL. A mistura reacional (1 mL) continha 30 – 50 μM do pesticida em um meio contendo acetonitrila (10% v/v) em tampão malonato e 2 μM enzima peroxidase. Para atividade da enzima manganês peroxidase o pH foi ajustado em 4 e para a enzima lignina peroxidase o pH

ficou em 3 na ausência de Mn (II). As reações ocorreram à temperatura ambiente e foram iniciadas pela adição de peróxido de hidrogênio com curso de duração de 5 a 10 minutos. A enzima peroxidase transformou apenas os pesticidas bromoxinil, diclorofenol e pentaclorofenol. Pentaclorofenol mostrou uma atividade específica de $10,9 \pm 0,9 \text{ min}^{-1}$ na ausência de Mn (II) e $0,23 \pm 0,9 \text{ min}^{-1}$ na presença de Mn (II), enquanto bromoxinil mostrou atividade específica de $68,1 \pm 0,7 \text{ min}^{-1}$ na ausência de Mn (II) e $3,9 \pm 0,18 \text{ min}^{-1}$ na presença de Mn(II). Por outro lado a transformação do diclorofenol não sofreu influência do Mn (II), sendo na presença de Mn (II) de $173,1 \pm 4,5 \text{ min}^{-1}$ e na ausência de Mn (II) de $184,7 \pm 6,7 \text{ min}^{-1}$. As constantes cinéticas foram determinadas em pH 4 e na ausência de Mn (II), sendo bromoxinil considerado o melhor substrato para peroxidase com constante catalítica – k_{cat} de 409 min^{-1} e constante de Michaelis e Menten K_M de $31 \text{ } \mu\text{M}$ para o pesticida. Os autores concluíram que a enzima peroxidase a partir do fungo *Bjerkandera adusta* é capaz de transformar in vitro pentaclorofenol, dicloro fenol e bromoxinil. A natureza química dos produtos obtidos mostrou que ocorreu desalogenação oxidativa produzindo quinonas e produtos poliméricos. A suscetibilidade dos outros pesticidas halogenados testados pareceu ser limitada pela presença de grupos fenoxil e por propriedades eletrônicas dos substituintes do anel aromático.

Como comentado durante a revisão bibliográfica, as pesquisas envolvendo processos biológicos para remoção ou degradação de pesticidas, ainda são restritas. Em contra partida, muitos estudos na área ambiental empregando fungos é crescente, pois estes microrganismos devido à produção de enzimas extracelulares contituem-se em potentes biodegradadores. Em assim sendo, o emprego desta nova biotecnologia para remover os pesticidas metil paration e atrazina de água, parece ser viável, podendo desta forma contribuir para minimizar os problemas ambientais de contaminação por estes compostos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em 5 fases: operação em batelada com metil paration e micélio de fungos; cultivo, produção e contagem de esporos de *Aspergillus niger* AN400; operação em batelada sob agitação com metil paration e esporos de *Aspergillus niger* AN400 e atrazina e esporos de *Aspergillus niger* AN400 e operação em reator de leito fixo e fluxo ascendente.

Os pesticidas utilizados foram Folisuper 600 com ingrediente ativo tiofosfato de dimetil – paranitrofenila 600 g/L, metil paration, e Gesaprim com ingrediente ativo atrazina 500 g/L. Folisuper 600 foi fornecido pela AGRIPPEC – QUÍMICA E FARMACÊUTICA S/A e Gesaprim foi obtido comercialmente.

A espécie escolhida para ser estudada nesta pesquisa, *Aspergillus niger*, é considerada assexual e saprófita, e pode ser encontrada em todo o mundo, sendo observada em uma grande variedade de habitats, por poderem colonizar inúmeros substratos.

5.1 Fase em batelada com metil paration e micélio de fungos

5.1.1 Seleção das espécies fúngicas

Foi preparada uma solução de metil paration, 0,5 mg/L, acrescida de 0,5 g de glicose/L e distribuída em seis recipientes que ficaram expostos ao ambiente, por 18 dias, tempo esse, no qual se observou mudança no aspecto macroscópico da solução. Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará – UFC, para análise qualitativa das espécies que cresceram..

5.1.2 Cultivo e preparo das espécies fúngicas

Após seleção das espécies, nas quais foram identificadas *Aspergillus niger*, *Penicillium marneffe* e *Geotrichum candidum*, optou-se pelas espécies filamentosas, *Aspergillus niger* e *Penicillium marneffe*, para serem utilizadas na fase em batelada. Os fungos filamentosos, escolhidos por possuírem características de crescimento que se sobrepõem às das leveduras, foram cultivados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia - UFC, em garrafas de Roux (Figura 5.1) contendo meio de cultura Sabouraud, por 28 dias, para completo crescimento das hifas.



Figura 5.1 – Garrafas de Roux com as espécies fúngicas identificadas

5.1.3 Composição dos substratos

Foram preparados dois substratos. O substrato 1 era composto por uma solução de água destilada e o inseticida metil paration; e o substrato 2 por uma solução composta por água destilada, metil paration e glicose na concentração de 0,5 g/L.

5.1.4 Montagem dos reatores

As espécies fúngicas cultivadas foram lavadas em água destilada, para completa remoção do meio de cultura, misturadas com água destilada e, em seguida, liquidificadas para obtenção de uma única solução com as espécies fúngicas.

Foram montados 48 reatores (Figura 5.2), divididos em oito lotes de seis reatores, sendo que, para cada lote, foi destinado um tempo de reação (TR). Lote 1 – TR = 10 h; Lote 2 – TR = 1 dia; Lote 3 – TR = 4 dias; Lote 4 – TR = 9 dias; Lote 5 – TR = 16 dias; Lote 6 – TR = 20 dias; Lote 7 – TR = 25 dias e Lote 8 – TR = 32 dias. Cada lote possuía dois reatores de controle (C) contendo 1,5 L do substrato 1; dois reatores contendo 1,5 L de substrato 1 e 10 mL de solução fúngica denominados (PF) e dois reatores contendo 1,5 L de substrato 2 e 10 mL de solução fúngica, denominados (PFG). Todos reatores foram recobertos com sacos plásticos PVC preto e aerados durante toda operação com compressores de ar com capacidade de 150 L/h e potência de 5 W.

Antes de os reatores serem fechados, foi retirada uma alíquota de 200 mL de cada um dos reatores C, PF e PFG para a determinação das variáveis iniciais. Após o final de cada tempo de reação também foi retirada nova alíquota para determinação das variáveis.



Figura 5.2 – Reatores de controle, PF e PFG em batelada

A temperatura foi monitorada durante toda a operação em batelada, mantendo-se em 27 ± 1 °C. As variáveis determinadas foram pH, temperatura, sólidos suspensos voláteis e concentração de metil paration.

Sólidos suspensos e pH foram determinados de acordo com os métodos contidos em (APHA, 1995).

Para determinação do metil paration foi empregado Cromatógrafo Líquido de Alta Resolução da Shimadzu (LC-10 AD) equipado com detector UV-Vis Diode Array (SPD-10AVP), forno de coluna (CTO-10AS), sistema de bomba de baixa pressão (SL-10AVP), operando com até quatro solventes. A separação do inseticida foi realizada em coluna Supelco C18 (25 cm x 4,6 mm D.I; partículas de 5 μ m) nas seguintes condições cromatográficas: sistema de gradiente com fase móvel acetonitrila : água – 80 %, tempo de corrida inicialmente de oito minutos e depois de cinco minutos, detecção em comprimento de onda de 270 nm e volume de injeção de 20 μ L. Na Figura 5.3 é mostrado o espectro no ultravioleta – UV do metil paration, o qual foi comparado com as amostras obtidas dos reatores em batelada.

Ao final da operação foram retiradas amostras dos reatores C, PF e PFG para nova análise microbiológica da biota.

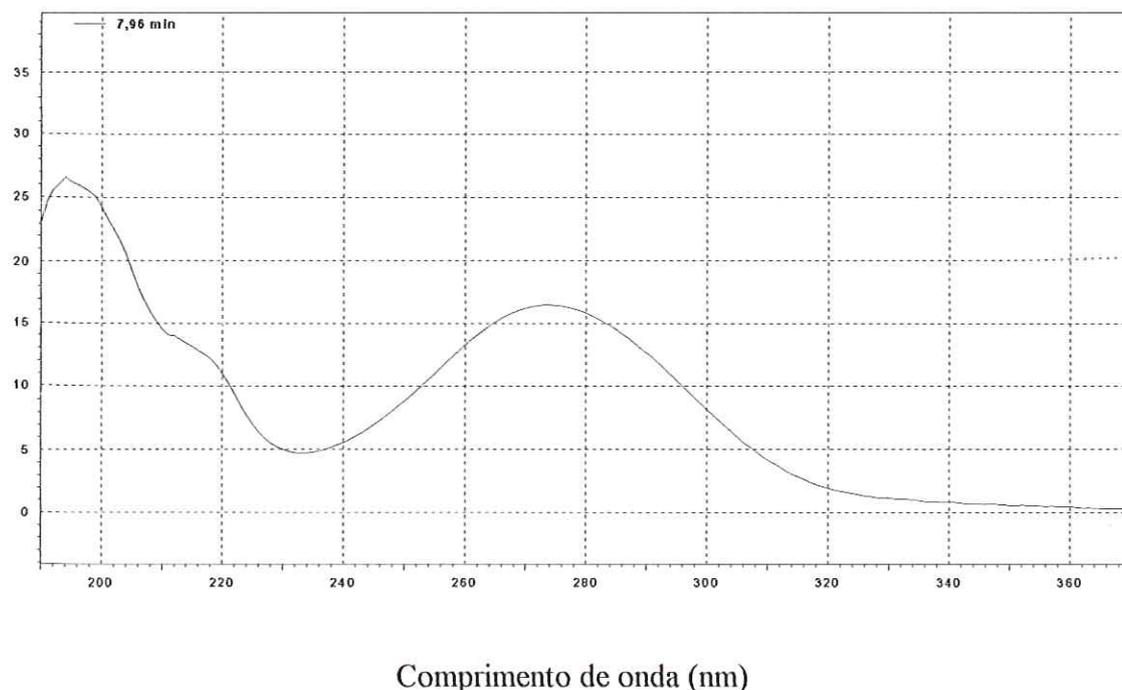


Figura 5.3: Espectro no UV do metil paration

5.2 Cultivo, produção e contagem de esporos de *Aspergillus niger* (AN400)

Com o objetivo de testar a habilidade da espécie *Aspergillus niger* AN400, procedeu-se o cultivo e produção a fim de empregá-la na pesquisa.

Aspergillus niger AN400, oriundo do Subdepartamento de Genoma de Fungos da Universidade de Wagenigen – Holanda, foi cultivado em placas de Petri com meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose Cloranfenicol – ASDC (Acumedia, Baltimore) acrescido de 1ml solução de Vishniac por litro de meio de cultura, por três dias, em estufa bacteriológica na temperatura de 30°C. Na Tabela 5.1 está apresentada a composição da solução de Vishniac.

Tabela 5.1 – Composição química – Solução de Vishniac

Produto Químico	g/L de solução
EDTA – etileno diamino tetracético	10,0
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,40
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,00
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,32
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,22
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,47
FeSO ₄ . 7H ₂ O	1,00

Os esporos de *Aspergillus niger* foram removidos das placas com 4 ml de solução de Tween 80 e transferidos para tubos de ensaio. Para contagem dos esporos preparou-se uma suspensão de esporos utilizando 50 µl de suspensão de esporos, previamente agitados em agitador Vórtex, mais 950 µl de solução de Tween 80, perfazendo uma diluição de 1:20. Em seguida foram transferidos 20 µl da solução preparada, para uma câmara de Neubauer, com profundidade de 0,1 mm e área mínima de 1/400 mm². A contagem dos esporos foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400 vezes em dezesseis campos. Para efeito de cálculo do número de esporos foi empregada a eq. (5.1).

$$\text{esporos/mL} = \text{esporos contados} \times \text{diluição} \times 2,5 \times 10^5 \quad (5.1)$$

5.3 Teste de toxicidade em placas

Foram preparadas 20 placas de Petri, divididas em lotes, sendo cada lote constituído por uma duplicata. O meio de cultura empregado foi ASDC, a concentração de metil paration variou de 0,075 a 60,00 mg/L, e a de atrazina de 0,05 a 25,00 mg/L. Cada placa foi inoculada com 2×10^6 esporos de *Aspergillus niger*/mL. Para a escolha da faixa de concentração de metil paration e atrazina, para serem testadas, levou-se em consideração o valor mínimo de detecção dos métodos para determinação de metil paration e atrazina (0,01 mg/L) e a solubilidade máxima dos agrotóxicos em água: metil paration (65 mg/L) e atrazina (33 mg/L). As placas foram incubadas a 30°C e observadas diariamente a fim de se verificar o crescimento do fungo. Na Tabela 5.2 é mostrada a distribuição das concentrações de metil paration e atrazina empregadas.

Tabela 5.2 – Concentrações de metil paration e atrazina empregadas no teste de toxicidade

Lote	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Metil paration (mg/L)	0,075	0,150	0,300	0,750	1,500	3,500	7,500	15,00	30,00	60,00
Atrazina (mg/L)	0,05	0,10	0,50	0,75	1,25	2,50	6,25	12,50	25,00	-

5.4 Fase em batelada com metil paration, atrazina e esporos de *Aspergillus niger* AN400

Esta fase diferencia-se da fase em batelada com metil paration e micélio de fungos, por trabalhar em condições estéreis, sob agitação e com esporos de *Aspergillus niger* AN400. As condições impostas, nesta fase, permitiram avaliar a eficiência de

remoção de metil paration apenas pela espécie de fungo escolhida, bem como verificar se a forma morfológica desenvolvida - *pellets*, devido à agitação, influenciaria eficiência de remoção de metil paration, com relação à fase anterior que foi realizada sem esterilização, com duas espécies distintas de fungo, na forma de suspensão de micélio, e sem agitação.

5.4.1 Substratos

Todos os substratos foram previamente esterilizados em autoclave por 15 min. a 121°C e 1,5 atm.

A composição dos substratos está representada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Composição dos substratos

Substrato	Pesticida	Cloranfenicol (0,05 g/L)	Glicose (0,5 g/L)	Sol. Vishinac (1mL/L)	Água destilada
1	Metil paration	X	-	X	X
2	Metil paration	X	X	X	X
3	Atrazina	X	-	X	X
4	Atrazina	X	X	X	X

(-) ausência; (x) presença

5.4.2 Montagem dos reatores em batelada sob agitação

O ensaio em reatores em batelada foi dividido em duas etapas: a primeira para estudo do Metil Paration e a segunda para estudo da Atrazina.

Primeira etapa – Metil Paration

Foram montados 18 erlenmeyers, divididos em três lotes. O primeiro lote, possuía seis reatores de controle (C) contendo 100 mL do substrato 1 com diferentes concentrações do metil paration; o segundo lote com seis reatores, que continham 100mL de substrato 1 com concentrações distintas do metil paration e 2×10^6 esporos/mL de *Aspergillus niger* AN400 (PF) e o terceiro lote continha 100ml do substrato 2 com concentrações distintas do metil paration e 2×10^6 esporos/mL de *A. niger* (PFG). Na Tabela 5.4 estão apresentadas as concentrações iniciais de metil paration.

Tabela 5.4 – Concentrações iniciais de metil paration empregadas na primeira etapa da fase em batelada com esporos de *Aspergillus niger* AN400

Reatores	Concentração de metil paration (mg/L)	Reatores	Concentração de metil paration (mg/L)	Reatores	Concentração de metil paration (mg/L)
C1	0,14	PF1	0,21	PFG1	0,62
C2	0,91	PF2	1,25	PFG2	1,25
C3	2,68	PF3	3,06	PFG3	4,67
C4	5,62	PF4	6,41	PFG4	6,53
C5	11,32	PF5	10,93	PFG5	14,52
C6	20,99	PF6	19,14	PFG6	24,89

C – reatores de controle com MP; PF – reatores com MP e fungo; PFG – reatores com MP, fungo e glicose

Todos os reatores foram recobertos com sacos plásticos de PVC preto e submetidos a 200 rpm em mesa agitadora. A temperatura foi monitorada durante todo o ensaio.

Os tempos de reação estudados foram: 1; 3; 6; 8; 10; 13; 22 e 27 dias. As variáveis determinadas foram pH, sólidos suspensos voláteis (SSV), e concentração de metil paration.

Segunda etapa – Atrazina

Adotou-se o mesmo procedimento que foi empregado para o estudo de metil paration, com modificações apenas para os substratos utilizados. No primeiro lote de reatores (C) foi utilizado o substrato 3, no segundo lote também o substrato 3 mais 2×10^6 esporos de *Aspergillus niger*/mL e os reatores foram denominados de AF, e no terceiro lote o substrato 4 mais 2×10^6 esporos de *A. niger*/mL e os reatores denominados de AFG. Na Tabela 5.5 estão apresentadas as concentrações iniciais de atrazina.

Os tempos de reação estudados foram: 1 dia; 4 dias; 7 dias; 11 dias; 18 dias; e 24 dias. As variáveis determinadas foram pH e concentração de atrazina.

Tabela 5.5 – Concentrações iniciais de atrazina empregadas na segunda etapa da fase em batelada com esporos de *Aspergillus niger* AN400

Reatores	Concentração de Atrazina (mg/L)	Reatores	Concentração de Atrazina (mg/L)	Reatores	Concentração de Atrazina (mg/L)
C1	1,054	AF1	1,345	AFG1	1,581
C2	2,862	AF2	3,220	AFG2	3,446
C3	6,574	AF3	6,516	AFG3	5,722
C4	10,545	AF4	11,280	AFG4	10,289

C – reatores de controle com ATZ; AF – reatores com ATZ e fungo; AFG – reatores com ATZ, fungo e glicose

5.4.3 Avaliação cinética da degradação de atrazina e de metil paration

O efeito da influência da glicose na velocidade de degradação dos pesticidas foi avaliado através de estudos cinéticos, utilizando-se perfis temporais de concentração de metil paration e atrazina para cada condição estudada.

Para cada perfil temporal, obtido para concentrações iniciais diferentes de metil paration foram obtidas as velocidades iniciais de reação (R_{MP_0}) estimadas em tempo

igual a zero pela equação de balanço de massa para o metil paration nos reatores operados em batelada, como:

$$R_{MP_0} = -\left. \frac{dC_{MP}}{dt} \right|_{t=0} \quad (5.1)$$

Na eq. (5.1), C_{MP} é concentração de metil paration (mg/L) e t é o tempo (dia).

Os valores de R_0 e o ajuste do modelo cinético foram feitos utilizando o método Levenberg-Marquardt - software Microcal Origin 5.0[®] (MARQUARDT, 1963).

Para a atrazina, as velocidades iniciais de conversão (R_0) foram estimadas empregando o modelo de primeira ordem com concentração residual, como:

$$R_{ATZ_0} = k_1 \left[\left(\frac{C_{ATZ}}{C_{ATZ_0}} \right) - \left(\frac{C_{ATZR}}{C_{ATZ_0}} \right) \right] \quad (5.2)$$

Na eq. (5.2), R_{ATZ_0} é a velocidade global de conversão de ATZ, C_{ATZR} é concentração residual de atrazina, k_1 é a constante cinética de primeira ordem, C_{ATZ} concentração final e C_{ATZ_0} concentração inicial de atrazina.

Inicialmente foram estimados os valores da constante cinética (k_1) para experimentos com e sem glicose. Para isso, foram utilizados os dados obtidos em todos os experimentos e traçados gráficos de concentrações normalizadas de atrazina (C_{ATZ}/C_{ATZ_0}) em função do tempo. O parâmetro cinético foi obtido por regressão não linear utilizando o método de Levenberg-Marquardt - software Microcal Origin 5.0[®] (MARQUARDT, 1963).

5.5 Métodos Analíticos

Nesta etapa a determinação do metil paration foi feita da mesma forma citada no item 5.1.4 e para a determinação de ATZ, também, foi empregado Cromatógrafo Líquido de Alta Resolução da Shimadzu (LC-10 AD) equipado com detector UV-Vis Diode Array (SPD-10AVP), forno de coluna (CTO-10AS), sistema de bomba de baixa pressão (SL-10AVP), operando com até quatro solventes. A separação do herbicida foi

realizada em coluna Supelco C18 (25 cm x 4,6 mm D.I; partículas de 5 μm) nas seguintes condições cromatográficas: sistema de gradiente com fase móvel acetonitrila: água – 80%, tempo de corrida inicialmente de oito minutos e depois de cinco minutos, detecção em comprimento de onda de 220 nm e volume de injeção de 20 μL . Para a confirmação de atrazina nas amostras foi criada uma biblioteca contendo os espectros de absorção no ultravioleta – UV (Figura 5.4).

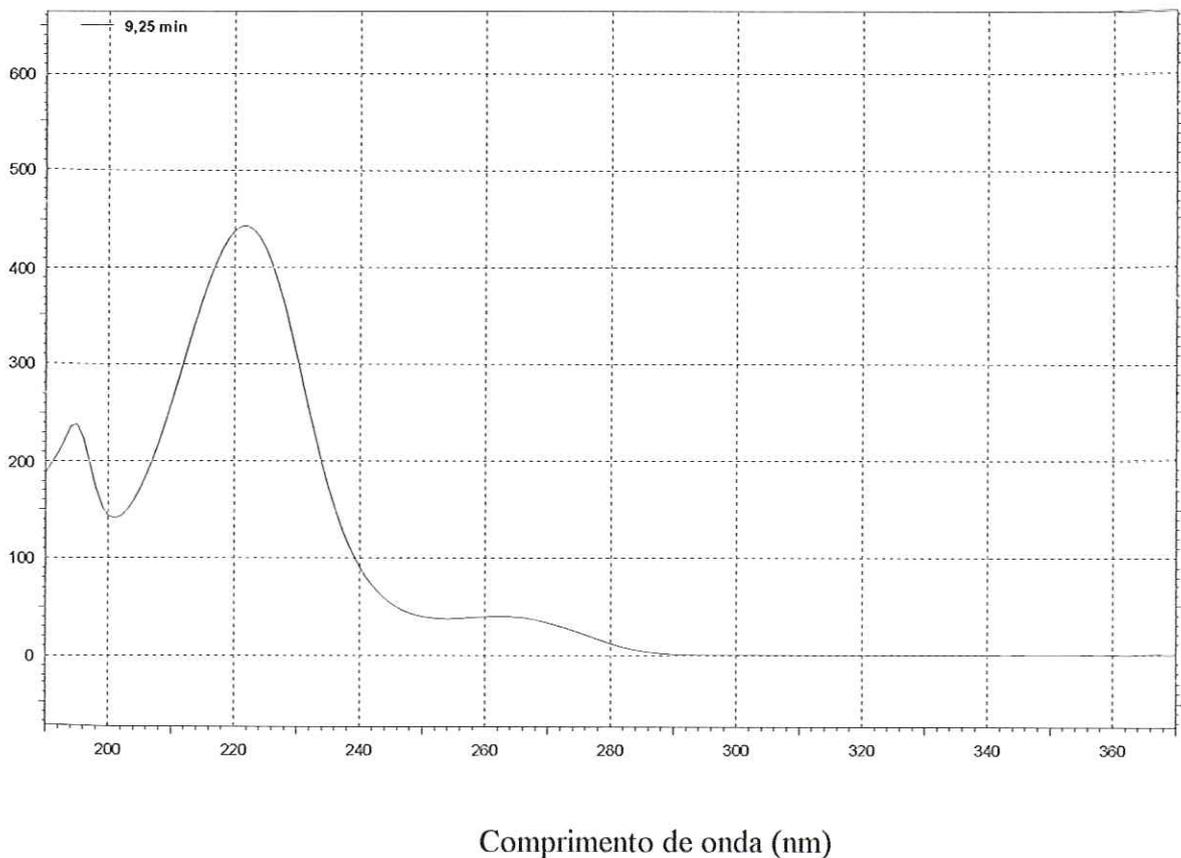


Figura 5.4 – Espectro no UV da Atrazina

5.6 Operação em reator de leito fixo e escoamento ascendente para degradação de metil paration

Foi montado um reator de leito fixo e fluxo ascendente (Figura 5.5) para estudo com metil paration. O reator foi confeccionado em acrílico com volume de 5 L; diâmetro interno de 90 mm; 80 cm de altura; dispositivos de entrada e saída da amostra

a ser tratada, e um dispositivo para entrada de ar, cujo fornecimento foi realizado por compressores de ar. Para entrada do afluente ao reator foi empregada bomba peristáltica.

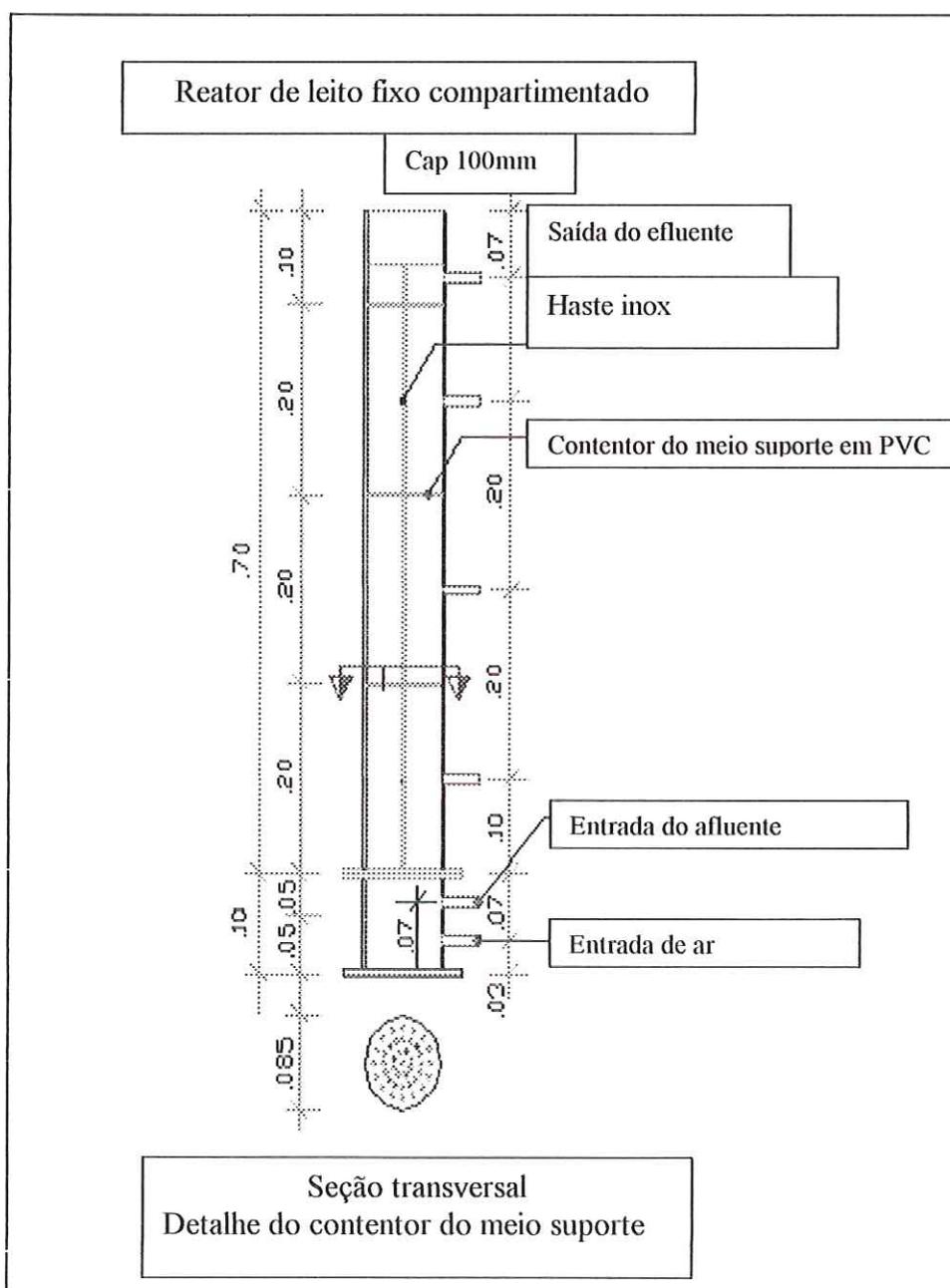


Figura 5.5 – Esquema do reator de leito fixo e fluxo ascendente empregado na pesquisa, para remoção de metil paration

O meio suporte empregado foi manta agulhada de poliamida, cortada em quadrados de 2 x 2 cm, pesada e acomodada dentro dos reatores.

O reator foi alimentado com solução de metil paration acrescido de 0,5 g glicose/L, 0,05 g cloranfenicol/L, como inibidor bacteriano, e 1 mL de solução de Vishniac/L; o pH ajustado numa faixa entre 4 e 5 com ácido clorídrico 1 N, haja vista ser esta faixa considerada ideal para crescimento do fungo.

As variáveis investigadas foram: pH, condutividade, temperatura e concentração de metil paration. A determinação do pesticida foi realizada conforme descrito no item 5.1.4, pH conforme APHA (1995), temperatura e condutividade por condutivímetro ORION Modelo 105. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

O tempo de detenção hidráulica estudado foi 12 h, e as concentrações de glicose testadas para esse TDH foram: 0,5 e 1,0 g/L.



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados e discutidos seguem a mesma ordem de chamada de Materiais e Métodos, ou seja, obedecendo as etapas executadas durante o experimento.

6.1 Operação em batelada com metil paration e micélio de fungos

Os resultados das determinações das amostras revelaram diminuição da concentração de metil paration, em todos os reatores, como mostrado na Figura 6.1. Os reatores de controle, PF e PFG alcançaram percentuais de remoção de metil paration de 93, 97 e 94%, respectivamente.

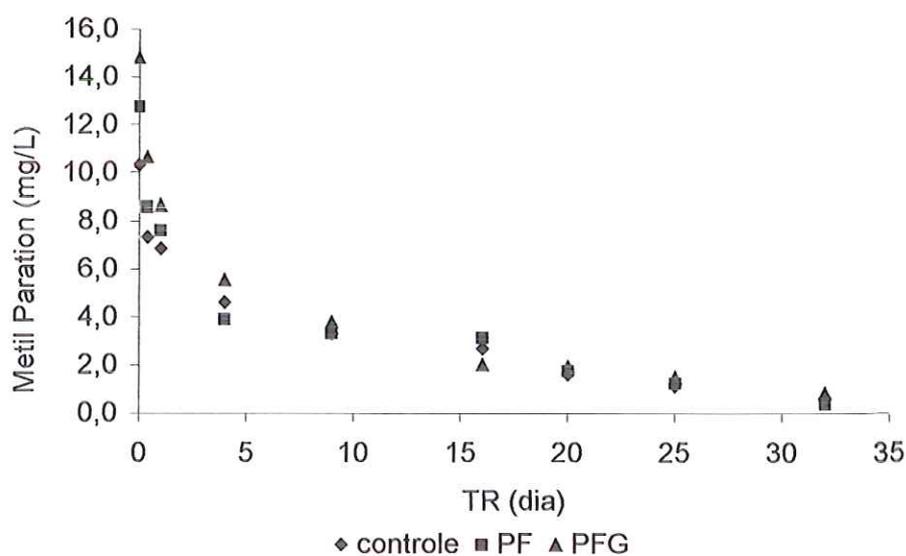


Figura 6.1: Variação da concentração de metil paration em função do tempo de reação (TR) da operação em batelada nos reatores de controle, PF e PFG

Esperava-se comportamento diferenciado nos reatores de controle, no que se refere à diminuição da concentração de metil paration, haja vista que, esses reatores não foram inoculados com espécies microbiológicas. Porém, quando se analisaram amostras desses reatores, ao final do experimento, detectou-se a presença da espécie fúngica *Alternaria alternata*. Por se tratar de uma espécie do ar, provavelmente, na hora da montagem e das coletas ocorreu contaminação e o pesticida também foi metabolizado nesses reatores.

Como metil paration é estável na faixa de pH entre 1 e 7 (IPCS, 1992), pôde-se observar que em todos os reatores de C, PF e PFG, o pH manteve-se sempre numa faixa ácida (Figura 6.2), condição esta, que não favoreceu a decomposição do metil paration, haja vista ser este orgnofosforado o mais resistente à hidrólise em valores de pH na região neutra a ácida. Santos e Rezende (2002), também verificaram que não houve hidrólise química quando estudaram a influência do meio reacional na fotodegradação de paration por radiação UV em água, com valores de pH na faixa que variou de ácida a neutra (5,50 a 7,25).

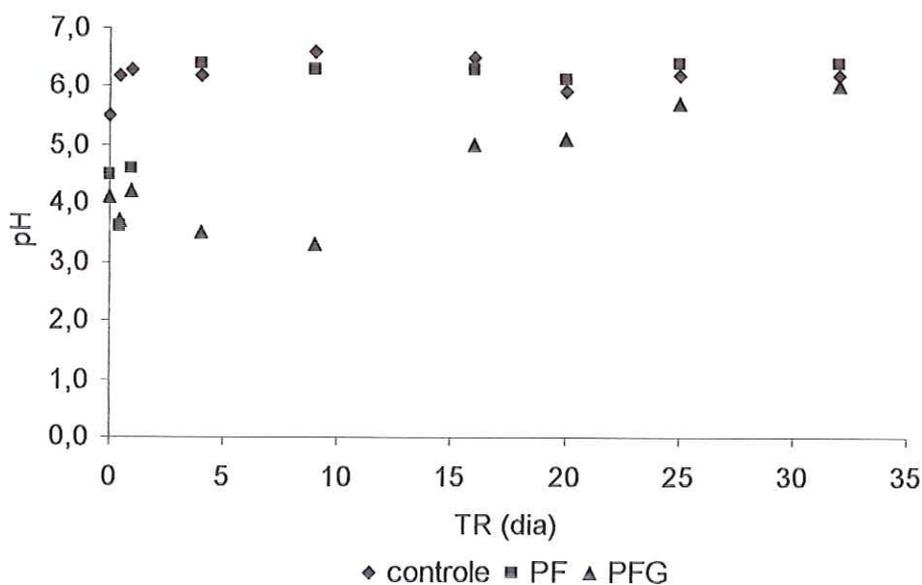


Figura 6.2 - Variação do pH em função do tempo de reação (TR) da operação em batelada nos reatores de controle, PF e PFG

O decaimento da concentração de metil paration em todos os reatores, não pode ser associado nem ao pH do meio, pois sua decomposição só seria favorecida em condições alcalinas, nem à fotodecomposição, pois todos os reatores, durante toda a operação, foram protegidos da luz, além de que segundo Cavell² (1979) *apud* Santos e Rezende (1999) o metil paration não é degradado com a luz solar natural. Portanto, a remoção de metil paration do meio foi exclusivamente, devida aos fungos, que devem ter utilizado este composto como fonte de carbono, ou tê-lo adsorvido na massa microbiana. Apesar de o pH do meio ter sido desfavorável para a decomposição do metil paration, a faixa encontrada durante o experimento (3,4 a 6,4), forneceu condições ideais para o crescimento do fungo. Coral et al. (2002) constataram em seu estudo que a enzima carboximetil celulase, produzida pela espécie *Aspergillus niger* Z10, teve ótima atividade numa ampla faixa de pH entre 3 e 9, sendo seu maior pico de atividade nos valores de pH 4,4 e 7,5.

Quando se comparam os cromatogramas do início da operação (TR = 0 dia) com os cromatogramas do TR = 32 dias (Figuras 6.3a a 6.3f), nos reatores C, PF e PFG, verificou-se que houve metabolização do metil paration, pois a área do pico mostrada no início da operação (TR = 0 dia) reduziu-se, como pode ser visto na Figura 10b, 10d e 10f e outros picos apareceram sugerindo a formação de novos compostos, provavelmente, seus metabólitos: paraoxon, aminofenol e p-nitrofenol. Luchini et al. (1996), identificaram esses metabólitos em estudo utilizando radiação gama do cobalto – 60, para induzir a degradação de paration em solução aquosa. Como houve formação de novos compostos o processo de adsorção é descartado como responsável pela remoção do metil paration, nesta pesquisa.

Provavelmente, a ação de enzimas produzidas pelos fungos, seja a responsável pela degradação de metil paration A condição do meio, com faixa de pH entre 3,3 e 6,4 encontrada durante toda operação, favoreceu o crescimento fúngico, por ser essa faixa considerada ótima para o crescimento (GRIFFIN, 1994). Valores de pH entre 3,4 e 6,4 também, favorecem para o *Aspergillus niger*, a indução dos sistemas enzimáticos: glicose oxidase, catalase e lactanase, que propiciam condições adequadas para o seu crescimento (WITTEVEEN, 1993).

² Cavell, B. D. (1979). Pest. Sci. 10: 177

De acordo com Melo e Azevedo (1997), embora pouco tenha sido descrito na literatura sobre a capacidade dos fungos em utilizar compostos aromáticos como única fonte de carbono, reações semelhantes às que ocorrem nos mamíferos são realizadas pelos fungos no metabolismo desses compostos. Estes organismos também se utilizam do sistema citocromo P-450 monoxigenase para incorporar um átomo de oxigênio no núcleo aromático.

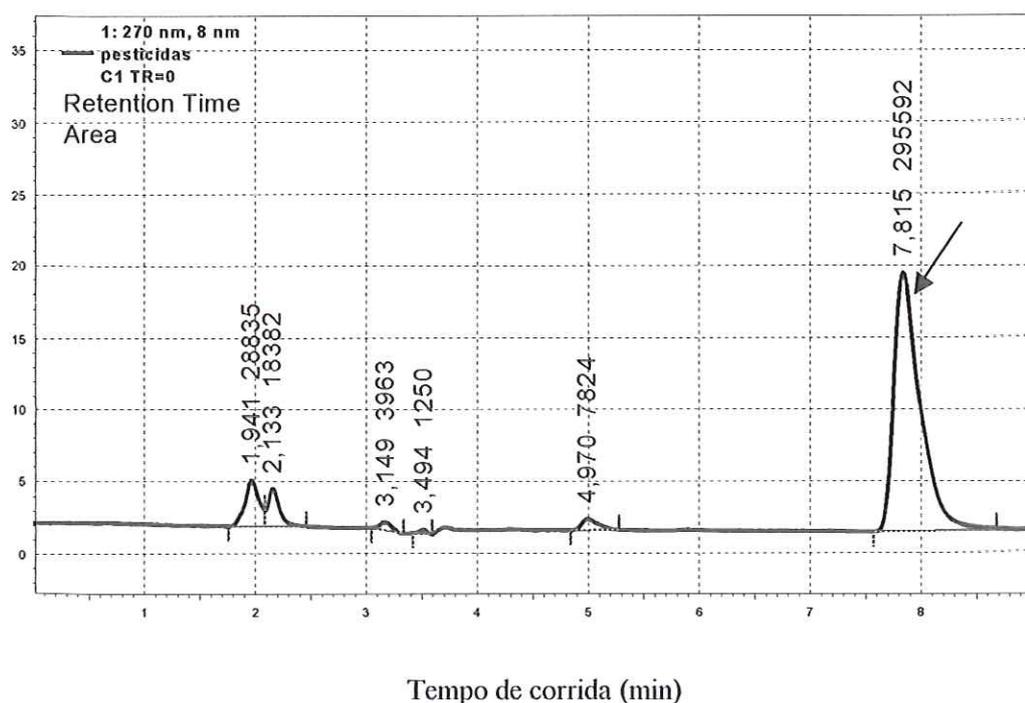


Figura 6.3a: Cromatograma do metil paration (controle) para o tempo de reação de 0 dia

Citocromo P450 monoxigenase está acoplado ao NADPH-redutase que funciona como fonte de elétrons para as reações de oxidação. É considerado o alvo central do metabolismo oxidativo, na detoxificação de xenobióticos. Catalisa a epoxidação do anel aromático, formando óxidos de arenos que através da epóxido hidrolase, formam trans-dihidrodióis ou rearranjam-se não enzimaticamente e formam fenóis (PRENAFETA BOLDÚ, 2002). Portanto, esse sistema enzimático deve ter sido ativado, e os possíveis produtos de degradação do metil paration, p-nitrofenol e aminofenol, terem se formado.

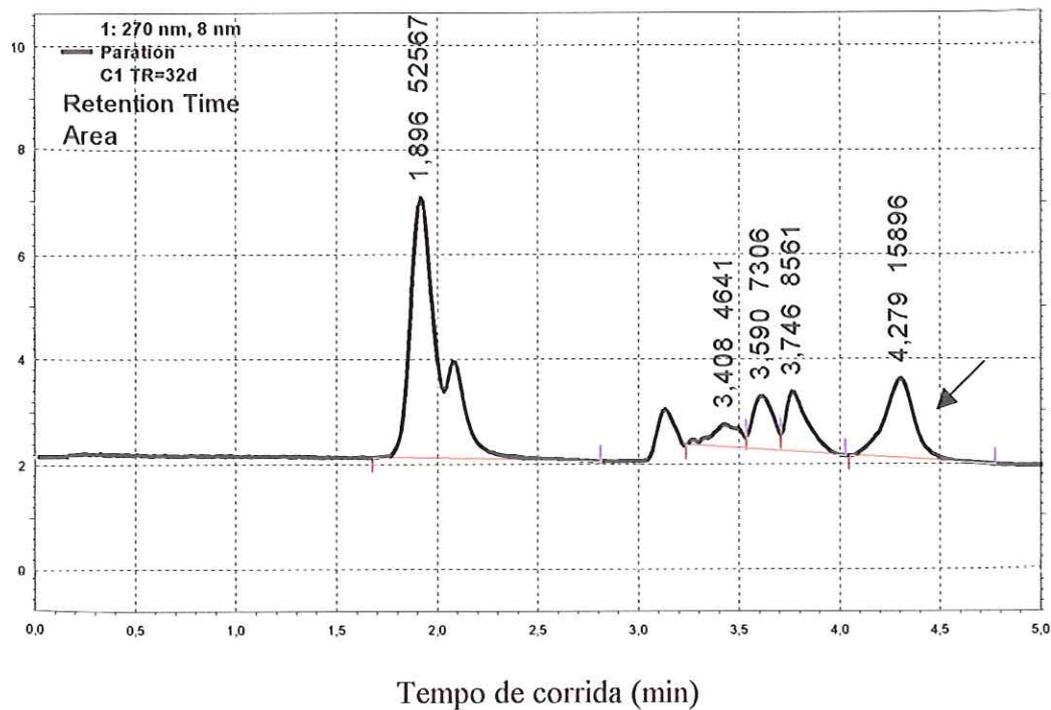


Figura 6.3b: Cromatograma do metil paration (controle) para o tempo de reação de 32 dias

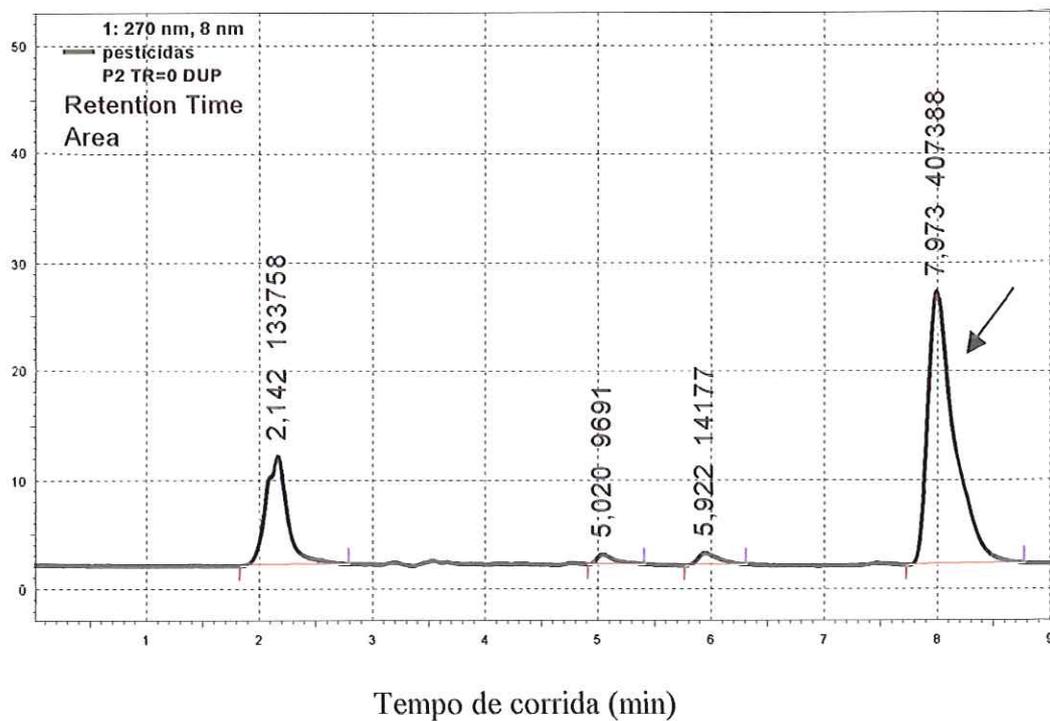


Figura 6.3c: Cromatograma do metil paration (PF) para o tempo de reação de 0 dia

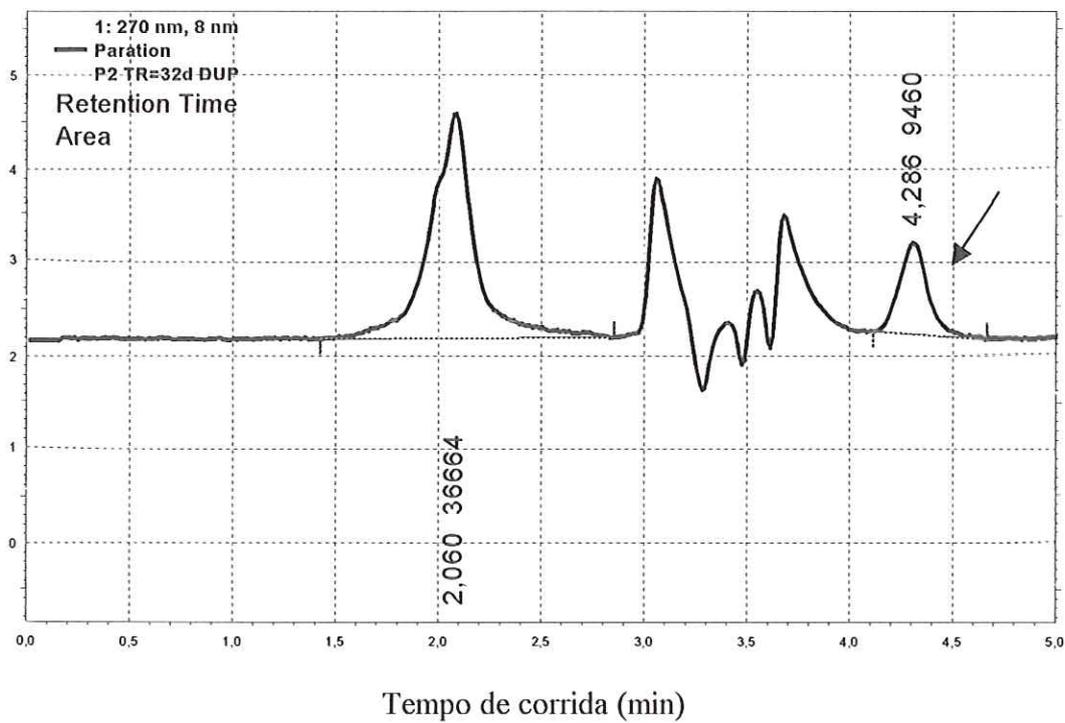


Figura 6.3d: Cromatograma do metil paration (PF) para o tempo de reação de 32 dias

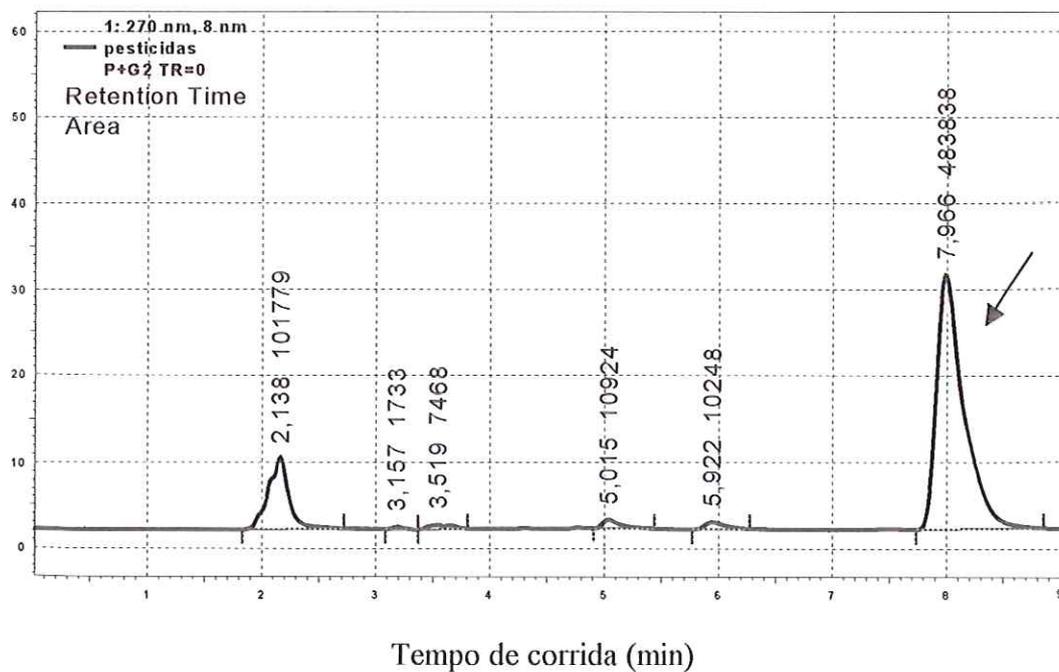


Figura 6.3e: Cromatograma do metil paration (PFG) para o tempo de reação de 0 dia

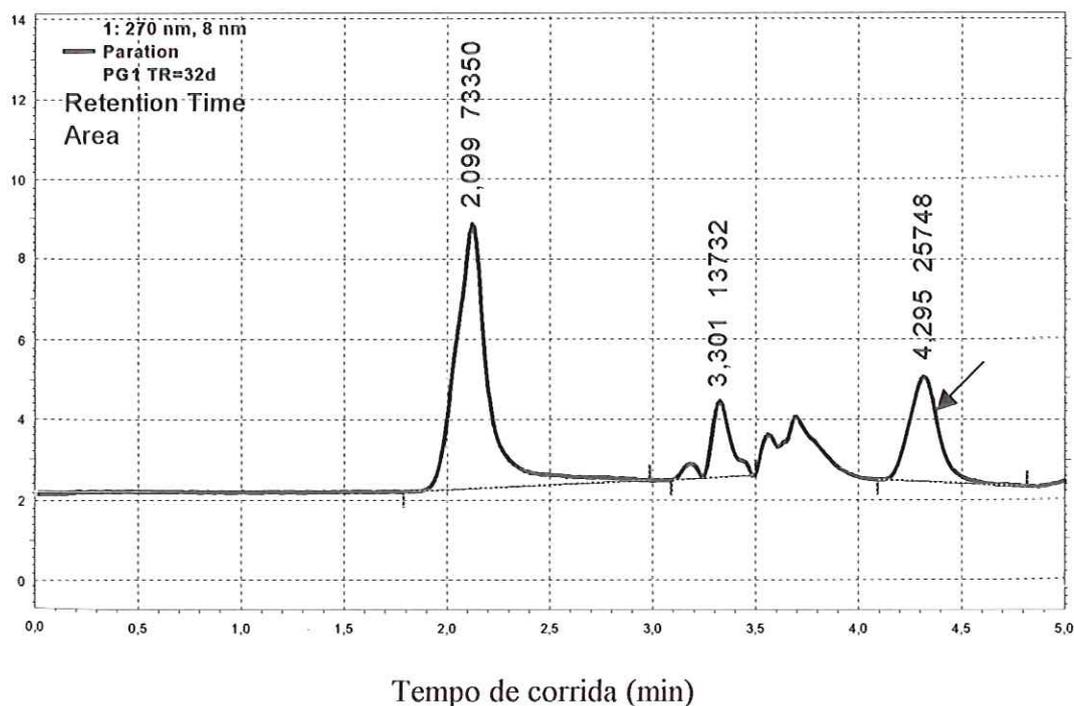


Figura 6.3f: Cromatograma do metil paration (PFG) para o tempo de reação de 32 dias

Preparações microssomais de citocromo P450, de fígado de rato foram capazes de ativar pesticidas organofosforados, por transformação do grupo tiofosfato da molécula, em grupo fosfato, formando o metabólito paraoxon, cuja toxicidade é superior à do próprio metil paration. Essa preparação também foi capaz de detoxificar metil paration por desarilação, produzindo p-nitrofenol (MA e CHAMBERS, 1994). Da mesma forma pode ter havido formação do paraoxon por atividade destes sistemas nos reatores em batelada.

Hernandez et al. (1998), estudando a oxidação de dez pesticidas organofosforados, entre eles metil paration, mediada pela enzima cloroepoxidase, produzida a partir do fungo *Caldaromyces fumago*, obtiveram transformação de sete dos dez pesticidas, para suas formas OXON. Ou seja, percebeu-se neste estudo similaridades de ação com citocromo P450, porém cloroepoxidase não foi capaz de clivar as estruturas oxons, diferentemente de citocromo P450.

Neste trabalho, os reatores PF e PFG inoculados com *Aspergillus niger*, apresentaram tendências similares no que se refere ao percentual de remoção de metil paration, nos reatores PF a remoção foi de 97% e nos reatores PFG a remoção foi de 94%, revelando que a presença de fonte primária de carbono, glicose, adicionada aos

reatores PFG, não foi significativa no processo de remoção do agrotóxico. Contudo, a concentração de SSV, até o último dia de reação, TR = 32 dias, foi maior em PFG do que em PF (Figuras 6.4a e 6.4b). Observou-se que houve aumento da massa fúngica conforme ocorreu redução de metil paration, corroborando com a hipótese de que metil paration pode estar sendo utilizado como fonte de carbono pelos fungos.

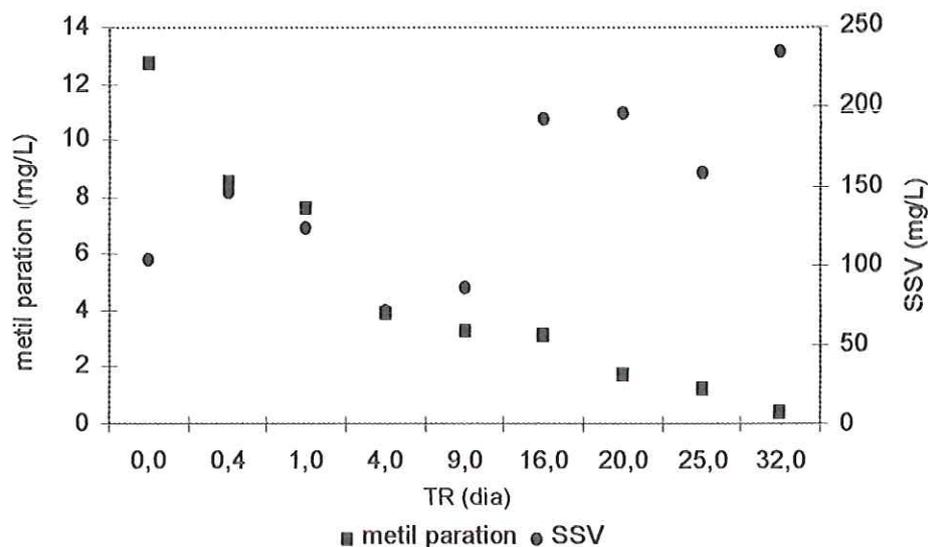


Figura 6.4a: Consumo de metil paration e aumento da concentração de SSV em função do tempo de reação nos reatores PF

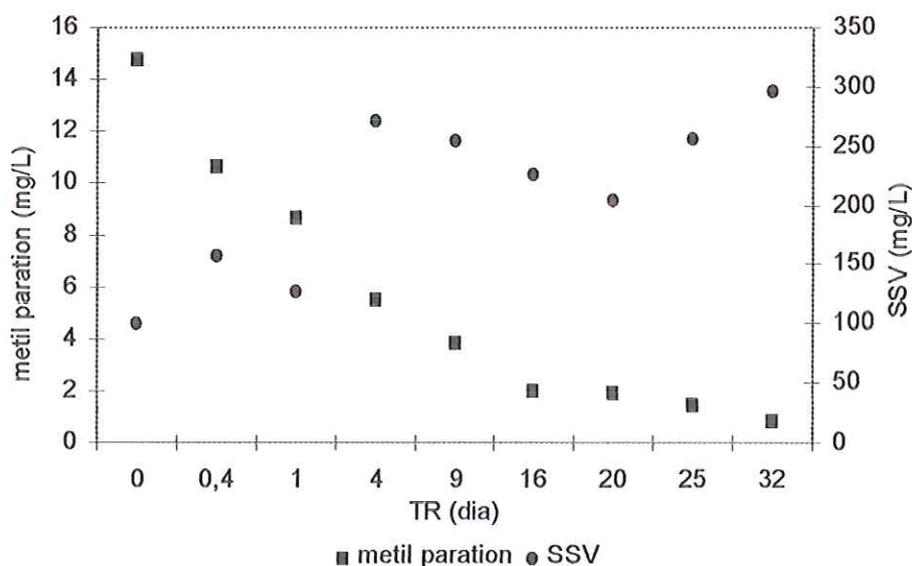


Figura 6.4b: Consumo de metil paration e aumento da concentração de SSV em função do tempo de reação nos reatores PFG

Nos reatores PF a biomassa cresceu de forma dispersa, enquanto que nos reatores PFG a biomassa cresceu aglomerada e aderida à pedra porosa (Figura 6.5). Esta condição de crescimento da biomassa nos reatores PFG, talvez tenha sido responsável pela menor remoção de metil paration encontrada, quando comparada com o percentual obtido nos reatores PF. O aglomerado celular pode ter limitado o transporte de substrato.

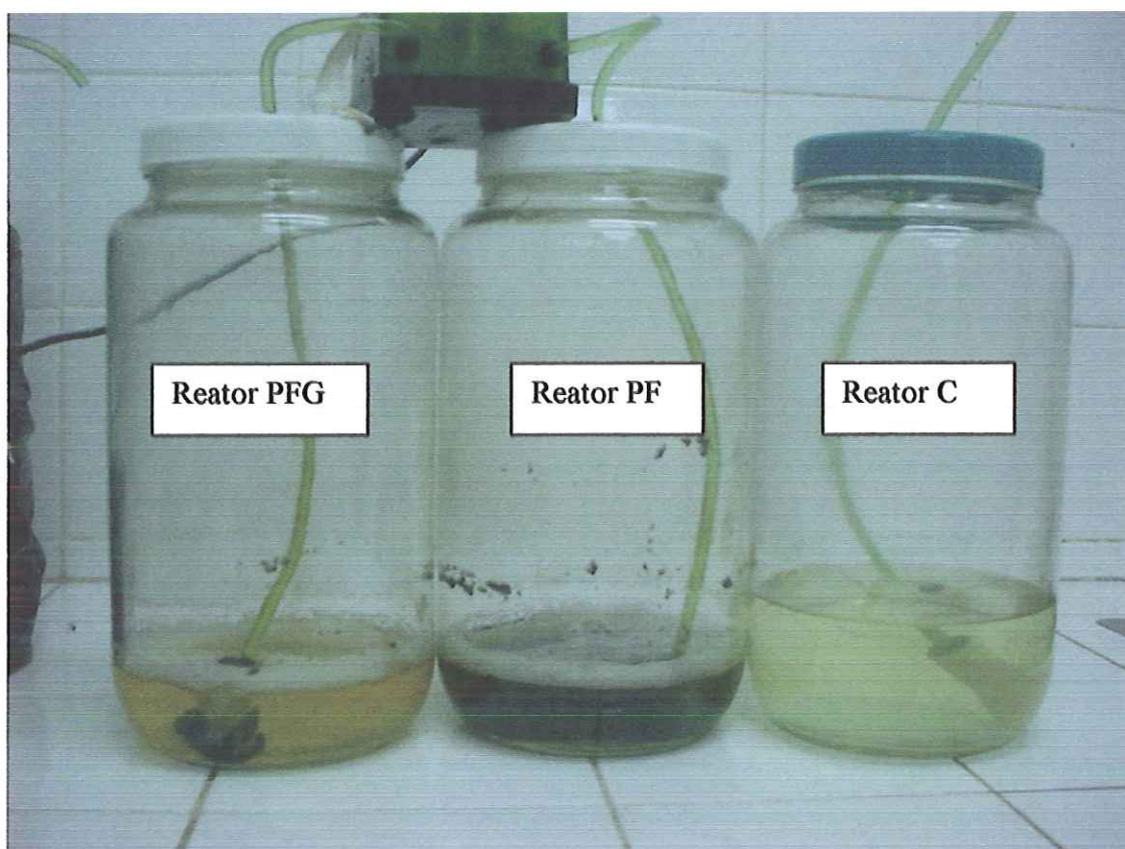


Figura 6.5 – Aspecto visual do crescimento da biomassa no interior dos reatores PF; PFG e C.

PF – reatores com solução de metil paration e fungos; PFG – reatores com solução de metil paration, fungos e glicose; C – reatores de controle apenas com solução de metil paration

A análise microbiológica de amostras retiradas dos reatores ao final da operação em batelada, mostrou que em C houve crescimento da espécie fúngica *Alternaria alternata* e da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, com predomínio da espécie fúngica; em PF a espécie inoculada *Aspergillus niger* continuou ativa durante todo o experimento e houve crescimento de *Escherichia coli*, contudo, com predomínio da espécie fúngica; e

em PFG foi verificada a manutenção da espécie inoculada *Aspergillus niger* (predominante) além, da presença de bacilos Gram positivo e negativo e cocos Gram positivo.

6.2 Operação em batelada com metil paration e esporos de *Aspergillus niger* (AN400)

No teste de toxicidade em placas, na primeira observação, 19 h após a incubação, não ocorreu crescimento de esporos de *Aspergillus niger* AN400 em nenhuma placa. Com 43 h de incubação, percebeu-se o crescimento do micélio nas placas com concentração de metil paration de: 0,075 mg/L; 0,15 mg/L; 0,30 mg/L; 0,75 mg/L; 1,50 mg/L; 3,50 mg/L e 7,50 mg/L. Nas demais concentrações nenhuma alteração macroscópica foi evidenciada. Completadas 72 h de incubação, quase todas as placas, com exceção da placa com concentração de 60,00 mg/L apresentavam esporos de *Aspergillus niger* em toda a superfície. Após 96 h de incubação, foi que a placa com concentração de 60,00 mg/L apresentou a superfície totalmente recoberta por esporos.

Segundo o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) – Guia de Saúde e Segurança (1992), os microrganismos podem utilizar metil paration como fonte de carbono e, estudos em comunidades naturais mostraram que concentrações de até 5 mg/L aumentaram a biomassa e a atividade reprodutiva. Bactérias e actinomicetos responderam, satisfatoriamente, enquanto fungos filamentosos e leveduras foram menos capazes de utilizar metil paration.

Contudo, o teste de toxicidade em placas mostrou que a espécie *Aspergillus niger* AN400 foi capaz de crescer em concentrações de metil paration de até 60 mg/L. Apesar de o meio imposto ao microrganismo oferecer condições nutricionais adequadas com fonte de carbono, proteínas, elementos-traço, e temperatura ideal ao seu crescimento, a presença de metil paration em concentrações elevadas não impediu a reprodução da espécie.

As concentrações de metil paration testadas são consideradas relativamente altas quando comparadas à legislação da União Européia que determina a concentração máxima permitida de 0,1 µg/L para organofosforados isolados e 0,5 µg/L para grupos de pesticidas na água potável (BENNO et al. 2001). Entretanto, no Brasil, a Resolução CONAMA N° 357 de 17 de março de 2005 estabelece valor máximo de 0,04 µg de

paration/L e de 35 μg de paration/L em efluentes, para que possam ser lançados em corpos d'água: CLASSE I e CLASSE III – águas doces, respectivamente.

Partindo-se do princípio de que *Aspergillus niger* AN400 foi capaz de se reproduzir em concentrações que variaram de 0,075 a 60,00 mg/L, provavelmente concentrações inferiores a estas, poderão responder bem ao tratamento biológico com *Aspergillus niger* AN400 Nos reatores (C), conforme Figura 6.6, a variação entre as concentrações iniciais e finais de metil paration praticamente não se modificou. Os fenômenos de hidrólise e fotodecomposição que eram passíveis de acontecer, foram impedidos pelas próprias condições do meio (pH entre 5 e 5,5) – condição desfavorável para degradação de metil paration e pela proteção dos reatores com plástico preto. Santos e Rezende (2002) estudaram a influência do meio reacional na degradação de paration por luz ultravioleta em água deionizada e verificaram que o aumento do pH de 5,50 para 7,25, na ausência de ácidos húmicos, aumentou a velocidade de fotodegradação do inseticida.

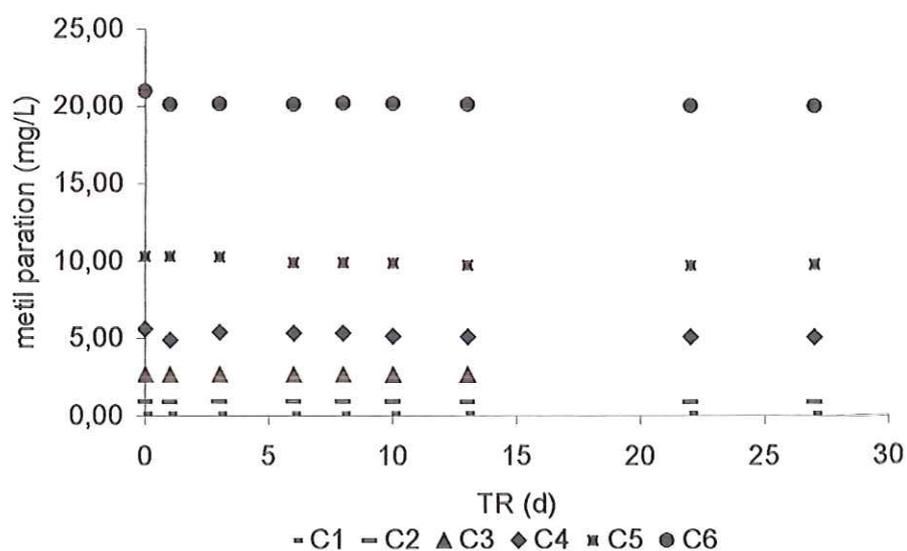


Figura 6.6 – Variação da concentração de metil paration em função do tempo de reação nos reatores controle (C)

Nos reatores PF, como pode ser visto na Figura 6.7, nos quais foram adicionados esporos de *Aspergillus niger* AN400, a variação entre as concentrações iniciais e finais, obteve percentuais de remoção satisfatórios quando comparados aos reatores sem fungo

(C). O melhor decaimento da concentração de metil paration foi em PF1 com 51% de remoção, com a menor concentração inicial de metil paration (0,21 mg/L). A menor remoção (2%) em PF ocorreu com a maior concentração de metil paration (19,14 mg/L). Como a quantidade de esporos de *Aspergillus niger* AN400 foi a mesma em todos os reatores PF, provavelmente o excesso de substrato - inseticida, neste caso funcionando como inibidor, no reator PF6 pode ter sido o responsável pela baixa remoção alcançada. Não se pode falar da incapacidade de utilização de metil paration no reator PF6, haja vista ter ocorrido uma boa remoção em PF1. Nestes reatores o pH do meio se manteve entre 5,0 e 5,5. Portanto, a degradação de metil paration alcançada foi exclusivamente pela presença de *Aspergillus niger*, haja vista que as condições reacionais foram as mesmas dos reatores de controle, nos quais a remoção não foi obtida.

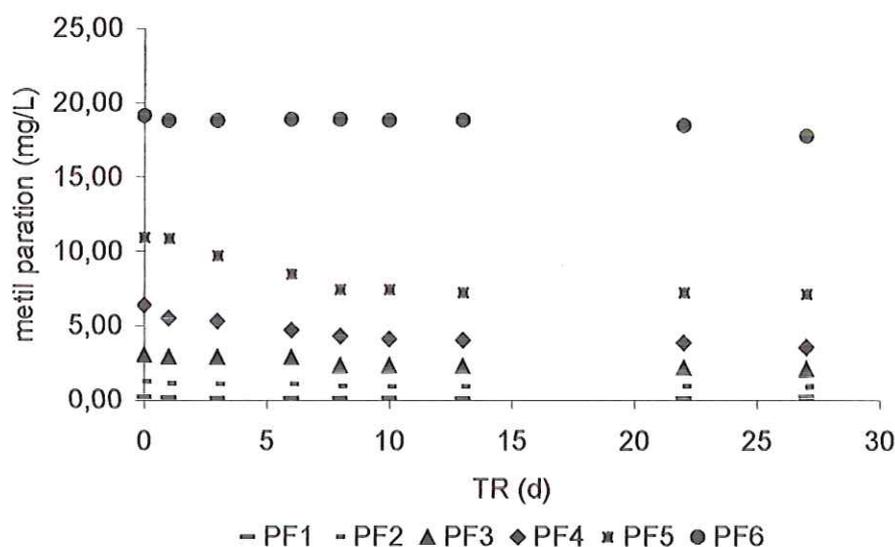


Figura 6.7 – Variação da concentração de metil paration em função do tempo de reação nos reatores PF

Houve remoção de metil paration em todos os reatores PFG (Figura 6.8). Ficou evidente que a presença de fonte primária de carbono (glicose) adicionada a esses reatores, contribuiu de forma satisfatória para o decaimento da concentração de metil paration. A melhor remoção alcançada foi de 82% no reator PFG1, cuja concentração inicial foi a menor desse grupo (0,62 mg/L). Até mesmo, com a maior concentração

inicial testada (24,89 mg/L), no reator PFG6, o percentual de remoção chegou a 43%. Segundo Griffin (1994), a presença de glicose promove encurtamento da fase lag, e com isso o início mais rápido da fase log (aumento do número de células). Ainda, segundo Griffin (1994), moléculas grandes e de difícil degradação, necessitam de uma fonte primária de carbono, para que os fungos possam realizar a biodegradação. Este fenômeno é conhecido como co-metabolismo ou metabolismo primário.

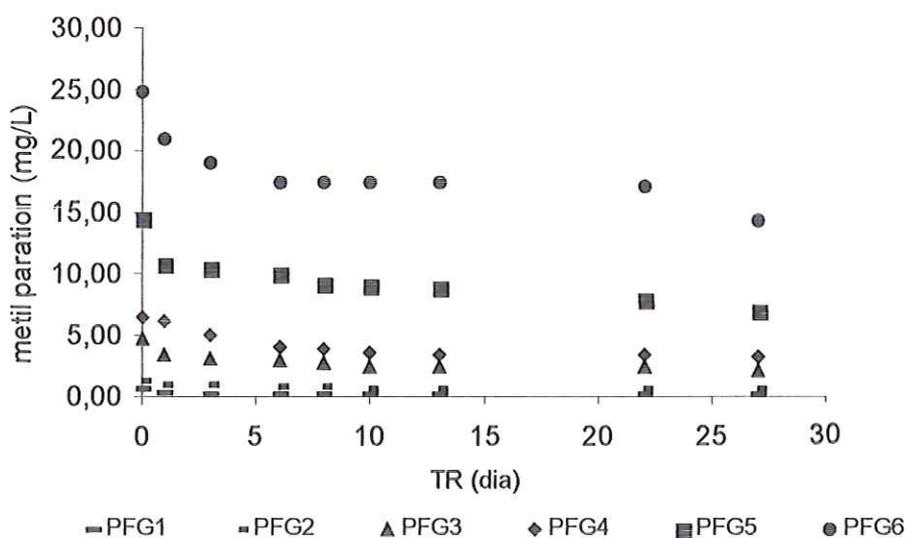


Figura 6.8 – Variação da concentração de metil paration em função do tempo de reação nos reatores PFG

A influência da glicose também pode ser comprovada a partir do estudo cinético realizado. Os valores das velocidades iniciais de reação (R_o) foram obtidos a partir dos perfis temporais tomados em várias concentrações iniciais eq. (6.1) e estão apresentados na Tabela 6.1.

O modelo cinético de primeira ordem foi o que melhor representou os dados de velocidade em função da concentração de Metil Paration, como:

$$R_o = k_1 \cdot S \quad (6.1)$$

Na eq. (6.1), R_o é a velocidade global de conversão de metil paration, S é concentração de metil paration e k_1 é a constante cinética de primeira ordem.

Para os experimentos sem a adição de glicose, a constante cinética foi de $0,063 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$, enquanto que para os experimentos com glicose a constante foi de $0,162 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$. Dessa forma, a adição de glicose resultou efetivamente em aumento na velocidade de conversão do metil paration.

Tabela 6.1: Velocidades iniciais de reação para experimentos com e sem glicose.

PF (sem glicose)		PFG (com glicose)	
Conc. MP (mg/L)	R _o (mg/L.h)	Conc. MP (mg/L)	R _o (mg/L.h)
0,21	0,0380	0,62	0,7104
1,25	0,0516	1,25	0,2376
3,06	0,0861	4,67	1,034
6,41	0,4692	6,53	0,6951
10,93	0,6783	14,52	2,806
19,14	*	24,89	3,786

*Os perfis temporais não permitiram a obtenção de dados confiáveis.

A produção celular nos reatores PFG ficou próxima de 83% (Figura 6.9), exceto para o PFG6 – reator com maior concentração do metil paration. Nos reatores PF à medida que a concentração de metil paration aumentava, ocorria diminuição do percentual de produção de SSV. Portanto, a glicose como substrato primário melhorou a remoção de metil paration, bem como para o crescimento celular.

Comparando-se os experimentos em batelada do metil paration com micélio fúngico e com esporos de *Aspergillus niger* AN400 (reatores PF5 e PFG5), verificou-se a diferença entre os percentuais de remoção do pesticida. A comparação se restringiu aos reatores PF5 e PFG5, pois as concentrações iniciais foram muito próximas da concentração inicial da batelada com micélio (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 – Concentrações iniciais de metil paration nos reatores com micélio de fungos e com esporos fúngicos de *Aspergillus niger* AN400

	Concentração inicial de MP (mg/L) (Reatores com micélio)	Concentração inicial de MP (mg/L) (Reatores com esporos)
PF	12,75	10,93
PFG	14,80	14,52

PF – reator com MP e fungo; PFG – reator com MP, fungo e glicose

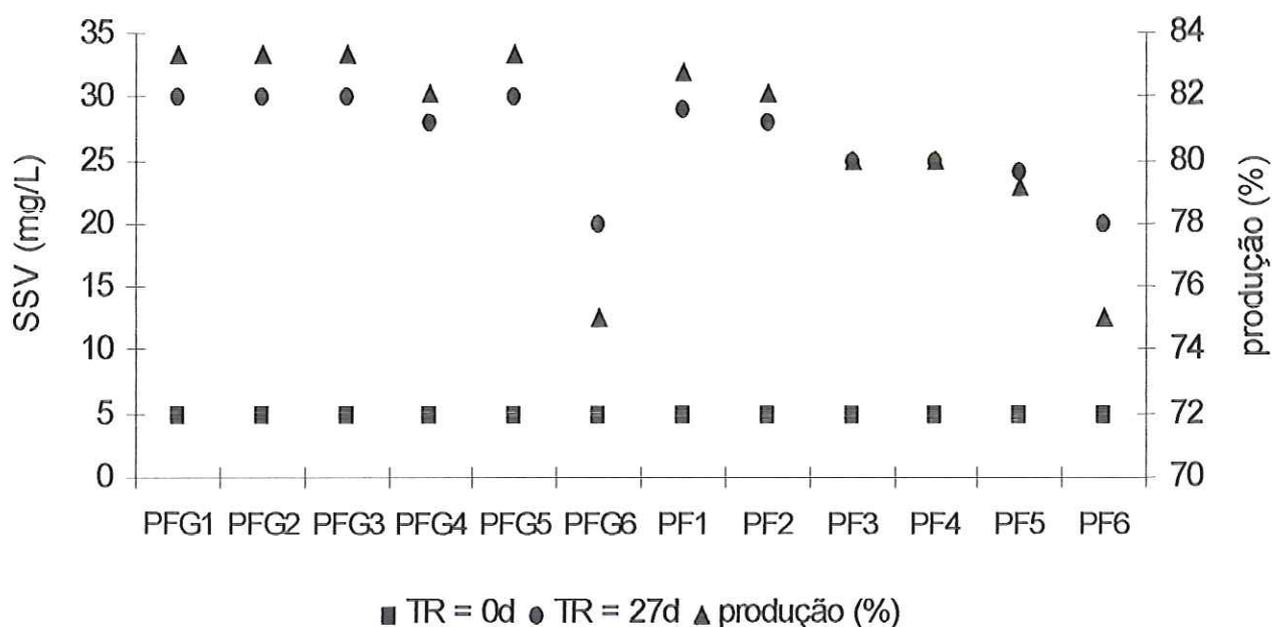


Figura 6.9 – Perfil de sólidos suspensos voláteis nos reatores PF e PFG

Os percentuais de remoção elevados na batelada com micélio (PF 97% e PFG 94%) pode estar associado à oxigenação fornecida pelos compressores de ar de forma contínua aos reatores durante todo processo de operação, fato que não ocorreu na batelada com esporos de *Aspergillus niger* AN400, cuja oxigenação ocorria em escala bem menor, pois os reatores não eram vedados e a agitação também favorecia entrada de oxigênio no meio. Segundo Witteveen (1993) uma das condições primordiais para a produção de enzimas pelos fungos é a disponibilidade de oxigênio, associada à concentração de glicose e ao pH em torno de 5,5.

A formação de aglomerado celular na forma de *pellets* durante o ensaio nos reatores com esporos *Aspergillus niger* AN400 e sob agitação (PF5 e PFG5), tenha contribuído para as limitações de transferência de massa e, por isso, talvez, não tenha obtido remoções melhores do poluente, quando comparado com a operação com micélio.

Cubas et al. (2004) estudaram a influência das velocidades rotacionais de 300 a 1100 rpm na transferência de massa em um sistema anaeróbio, com biomassa imobilizada e, constataram que ocorreu aumento na velocidade de degradação da matéria orgânica, quando a velocidade rotacional aumentou de 300 para 900 rpm e que a concentração de substrato residual diminuiu significativamente com velocidade de rotação acima de 800 rpm. Sendo assim, talvez, um aumento na velocidade rotacional,

nos reatores PF5 e PFG5 tivesse conduzido a uma diminuição de limitação de transferência de massa e melhorado a eficiência de remoção do inseticida.

Outro ponto que deve ser considerado para melhor eficiência na operação com micélio, foi o fato de ter ocorrido contaminação dos reatores, e ao invés de ser ter uma única espécie *Aspergillus niger* AN400 passou-se a ter um consórcio de microrganismos (fungos e bactérias).

6.3 Operação em batelada com atrazina e esporos de *Aspergillus niger* AN400

No teste de toxicidade foi verificado crescimento de *Aspergillus niger* AN400 em todas as concentrações de atrazina testadas. A placa de Petri com concentração de 25 mg/L estava completamente preenchida de esporos ao final de cinco dias. Enquanto que, as placas com as demais concentrações, tal fato ocorreu com apenas três dias de incubação. Vale ressaltar que nas primeiras 24 h, já havia formação de micélio em todas as concentrações testadas. Ou seja, atrazina, nestas condições não funcionou como inibidor ou tóxico para *Aspergillus niger* AN400. Singh et al. (2004) estudando a ação de *Acinetobacter* na mineralização de atrazina verificaram que este microrganismo também foi capaz de crescer numa concentração de atrazina de até 250 mg/L.

Muitos pesquisadores têm demonstrado que microrganismos isolados de locais contaminados com atrazina foram capazes de desalquilar a molécula de atrazina em meio limitado de carbono (BEHKI e KAHN, 1996); mineralizar e usar atrazina como única fonte de carbono e energia (MANDELBAUM et al. 1995; TOPP et al. 2000); utilizar o anel heterocíclico como fonte de nitrogênio (BICHAT et al. 1999) e mineralizar atrazina e seus metabólitos como fonte de nitrogênio em meio suplementado com carbono (MANDELBAUM et al. 1993; TOPP et al. 2000).

Os reatores de controle praticamente não houve decaimento na concentração de atrazina (Figura 6.10), com exceção de C3 que apresentou 6% de remoção. Confirmando, desta forma, a não degradação da atrazina por fatores abióticos. Segundo EPA (2003) a persistência de atrazina em água é variável, pois é influenciada pelas condições externas e do meio. Por exemplo, a hidrólise de atrazina só ocorre em meio ácido com pH menor ou igual a 4, enquanto a fotólise só é iniciada com pH entre 6 e 8 (EPA, 2003). Como durante toda a operação o pH manteve-se entre 4 e 5, condições externas como a luz não influenciaram na transformação da atrazina.

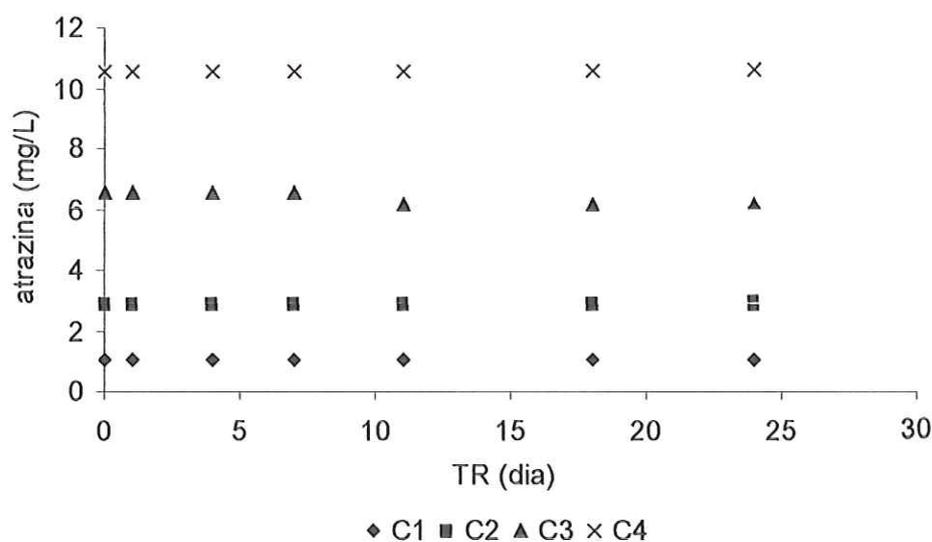


Figura 6.10 - Variação da concentração de atrazina em função do tempo de reação (TR) nos reatores de controle

Os reatores sem glicose apresentaram remoção de ATZ em todas as concentrações estudadas (Figura 6.11). Porém, o melhor perfil de remoção (25%) ocorreu em AF4 – reator que possuía maior concentração inicial.

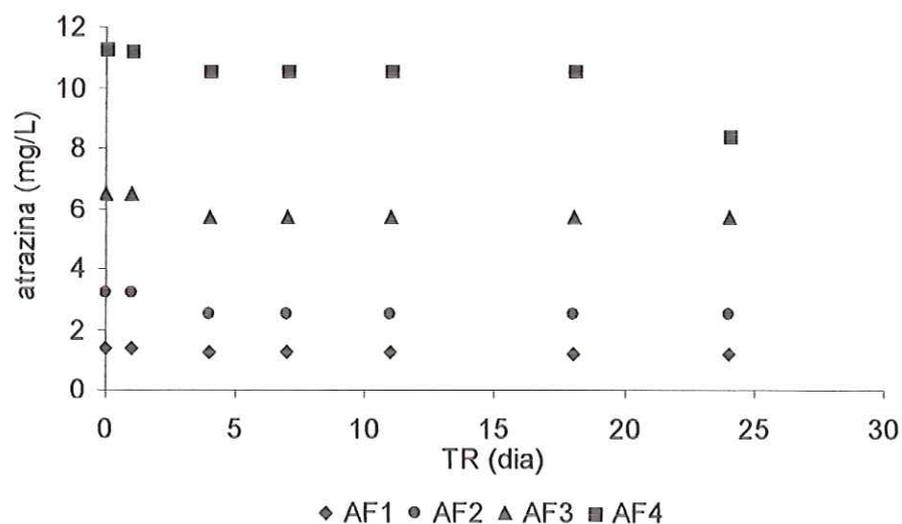


Figura 6.11 – Variação da concentração de atrazina em função do tempo de reação (TR) nos reatores AF

Nos reatores com fonte primária de carbono, o melhor decaimento da concentração de atrazina ocorreu em AFG1 – 45%, reator de menor concentração inicial - 1,58 mg/L. Na Figura 6.12 é mostrada a variação da concentração de atrazina em

função dos tempos de reação testados. Nos demais reatores os percentuais de remoção foram muito parecidos com a resposta dos reatores nos quais não foi adicionada fonte externa de carbono.

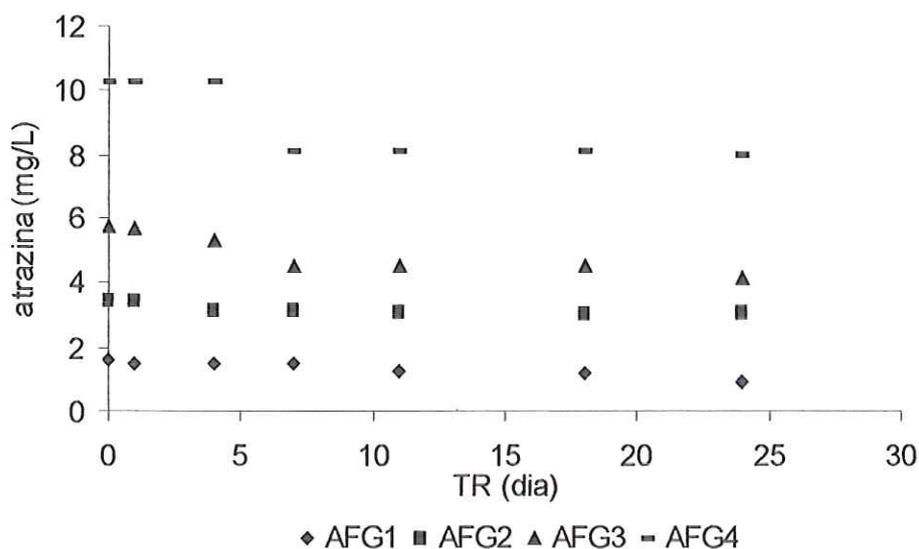


Figura 6.12 – Variação da concentração de atrazina em função do tempo de reação (TR) nos reatores AFG

Ghosh e Philip (2004) estudando a degradação da atrazina em condições anaeróbias verificaram que a presença de um co-metabólito (glicose) resultou em melhor mineralização do herbicida do que no reator que empregou atrazina como única fonte de C e N. O reator que recebeu 150 mg/L de glicose e concentração de atrazina de 15 mg/L alcançou 43 a 45% de remoção em cinco dias. Entretanto, a remoção de atrazina no reator que utilizou somente atrazina como fonte de carbono foi de 50% e 60% em 35 e 100 dias e no reator que usou atrazina como fonte de carbono e nitrogênio a remoção foi de 30 a 45% em 150 dias. Nesta pesquisa os 45% de remoção de atrazina, nos reatores com 0,5 g glicose/L, aconteceu com 24 dias de operação. Diferentemente, de Singh et al. (2004) que estudaram a degradação de atrazina e simazina com o fungo *Pennisetum rhizosphere*, com glicose e sem glicose, e verificaram diferença insignificante de degradação de atrazina no meio com glicose. Isso levou o autor a concluir que o fungo no meio sem glicose utilizou os herbicidas como única fonte de energia.

Em estudos anteriores, como de Erickson e Lee (1989), era aceito que a cadeia alquil presente na molécula de atrazina era considerada a única fonte de carbono e energia disponível para os microrganismos através do processo de oxidação e, o anel triazínico era considerado como fonte de nitrogênio (MANDELBAUM et al. 1993).

Porém, nos estudos de Yassir et al. (1999) verificando a degradação da atrazina em solos submetidos a diferentes práticas de cultivo, por meio da cinética de mineralização do radical alquil da cadeia e do anel marcado com carbono¹⁴, evidenciaram que em solos adaptados, a atrazina seria usada como fonte de carbono pelos microrganismos.

Segundo Feakin et al. (1994), o primeiro estágio da biodegradação de triazínicos é a desalquilação e desmetilação, as quais conduzem à remoção de nitrogênio do anel triazínico.

Nesta pesquisa, a fonte de nitrogênio adicionada, através da solução de Vishniac foi da ordem de 0,22 g/L. Segundo Mandelbaum et al. (1995) a bactéria *Pseudomonas* sp, em condições aeróbias, utiliza atrazina como única fonte de nitrogênio. Nesta pesquisa, a presença de nitrogênio pode ter inibido a assimilação da atrazina como fonte de nitrogênio e conseqüentemente ter refletido no percentual de remoção encontrado, nesta operação em batelada. Em contrapartida, segundo Bichat et al. (1999) a degradação de atrazina por *Pseudomonas* ADP na presença de fonte de nitrogênio, não foi afetada.

Gu et al (2003) empregando três tipos de solo, sob condições metanogênicas, verificaram desaparecimento de atrazina e de cimazina, inicialmente com 150 dias de incubação e, após 300 dias, ainda restava 30 % da concentração inicial. Nesta pesquisa, 45% de remoção de atrazina ocorreu com 24 dias, tempo este bastante inferior quando comparado com o da pesquisa de Gu et al (2003).

Durante esta fase experimental a influência da glicose foi verificada através do estudo cinético e os valores das velocidades iniciais de reação (R_{ATZ_0}) foram obtidos a partir dos perfis temporais tomados a várias concentrações iniciais. O modelo cinético de primeira ordem (Eq.1) foi o que melhor representou os dados obtidos experimentalmente.

Para os experimentos sem a adição de glicose, o valor de R_{ATZ_0} foi 0,023 d⁻¹, enquanto que para os experimentos com glicose R_{ATZ_0} foi 0,022 d⁻¹. Dessa forma, a adição de glicose parece não ter influenciado significativamente a velocidade de remoção de atrazina.

Estudos envolvendo sistemas enzimáticos de microrganismos revelam que, dependendo da concentração do composto tóxico, esses sistemas enzimáticos podem ser ativados e, assim promoverem a degradação do composto. O sistema enzimático citocromo P450 monooxigenase é de extrema importância para o metabolismo dos xenobióticos e provavelmente deve ter sido induzido e promovido a remoção de 45% de atrazina no reator AFG4 – reator de maior concentração inicial. Londoño et al. (2004) estudando a indução de P450 em insetos da espécie *Chironomus tentans* após exposição a concentrações variadas de atrazina, observaram que as larvas do mosquito expostas às soluções aquosas com concentrações de atrazina de 0,001; 0,01 e 0,1 mg/L por 90 h não promoveu indução do sistema P450. Entretanto, quando as larvas dos mosquitos foram expostas às concentrações de 1,0 e 10,0 mg/L, houve uma expressão significativa da enzima P450. Ou seja, para ativação do sistema enzimático P450, são necessárias concentrações elevadas da atrazina.

6.4 Operação em reatores de leito fixo e escoamento ascendente

6.4.1 Primeira fase de operação com tempo de detenção hidráulica de 12 h e 0,5 g glicose/L

O reator contínuo nesse primeiro ciclo de operação manteve o pH numa faixa ácida, com valores de saída sempre menores na maioria dos pontos coletados, indicando a produção de ácidos (Figura 6.17), condição esta que não favorece a hidrólise de metil paration.

Os baixos valores de condutividade, apesar dos valores de saída apresentarem-se sempre maiores na maioria dos pontos coletados (Figura 6.18), também não favorecem a hidrólise do inseticida. Como citado anteriormente, a hidrólise só é favorecida com condutividade elevada. Isso significa que as remoções alcançadas para metil paration e DQO são devido à atividade fúngica, ficando a remoção média de DQO em 47% e a de metil paration em 40% com 12 h de tempo de detenção hidráulica.

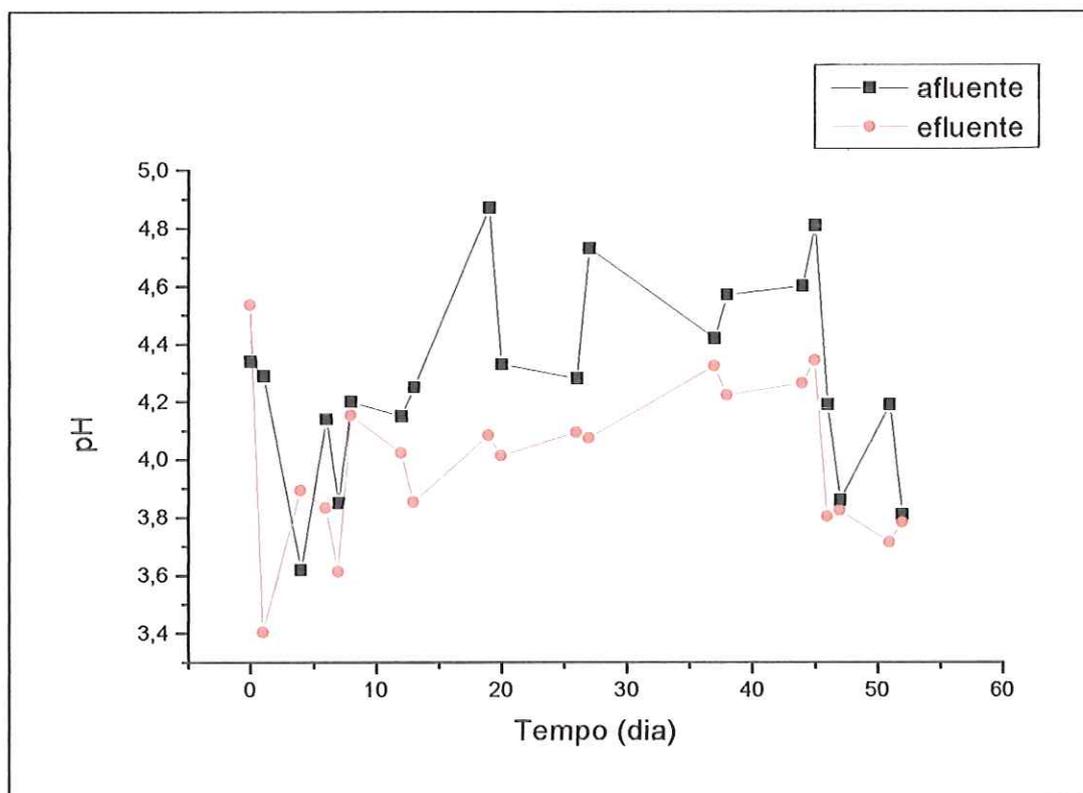


Figura 6.17 – Variação do pH com TDH de 12 h e 0,5 g/L de glicose

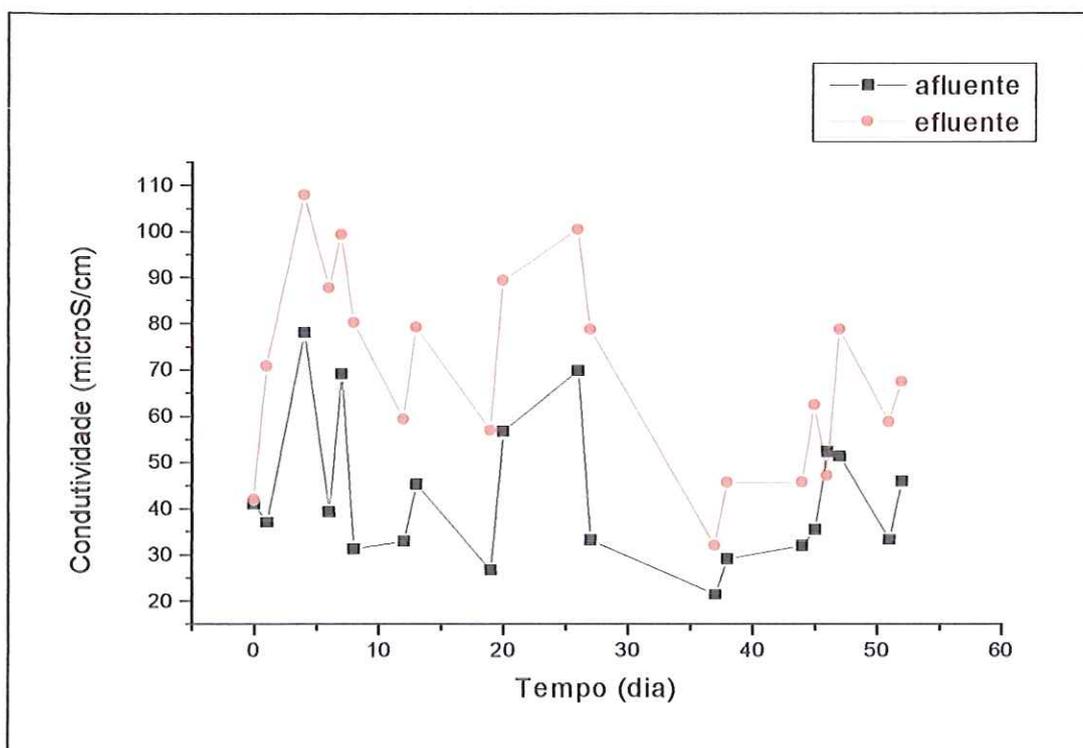


Figura 6.18 - Variação da condutividade com TDH de 12 h e 0,5 g/L de glicose

A variação na concentração afluente de matéria orgânica expressa em DQO, observada na Figura 6.19, é decorrente de preparações, ora diluídas ora concentradas, com relação à glicose durante a composição da água sintética.

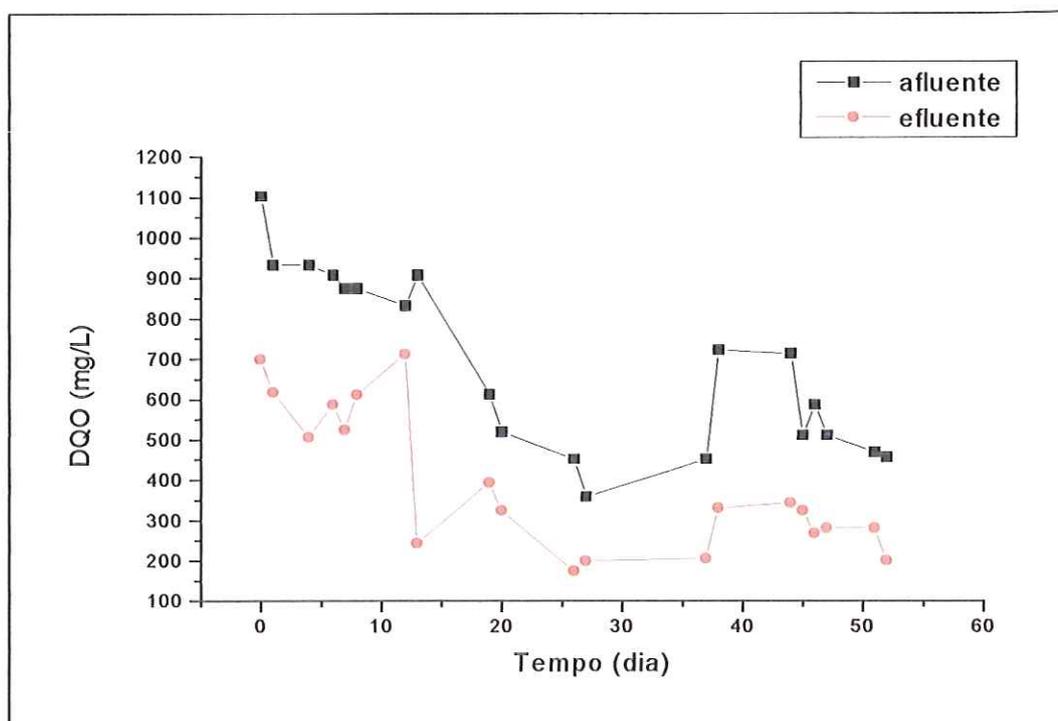


Figura 6.19 – Variação da DQO com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L

Na Figura 6.20 é mostrada a variação da concentração de metil paration com 12 h de tempo de detenção hidráulica e 0,5 g glicose/L.

A eficiência média de remoção de metil paration foi $40 \pm 13\%$. O biofilme formado, aderido ao meio suporte, promoveu boa utilização do substrato com 12 h de tempo de detenção hidráulica. Na operação em batelada comentada anteriormente a eficiência de remoção de metil paration em PFG1 foi de 82% para a menor concentração testada (0,62 mg/L) e de 43% para a maior concentração testada (24,68 mg/L), com 27 dias de tempo de reação. Apesar de se tratarem de regimes distintos de operação, é considerável a diferença de tempo, 12 h e 27 dias, encontradas nestas operações. Segundo Papagianni e Matthey (2004), em seu estudo, avaliando aspectos fisiológicos de culturas de *Aspergillus niger* livre e imobilizado para produção de ácido cítrico com concentrações variadas de glicose, verificaram que a velocidade de produção do ácido foi maior com micélio imobilizado e concentração crescente de glicose. A limitação do meio difusional nos *pellets* foi cerca de 1000 vezes maior do que do sistema imobilizado, concluindo dessa forma que os *pellets* livres limitam tanto a passagem de oxigênio como de glicose. Ainda, segundo Papagianni e Matthey (2004) as

técnicas de imobilização conduzem ao aumento significativo na produção de ácidos orgânicos, enzimas e oligossacarídeos, além de minimizar problemas relacionados às formas morfológicas produzidas, pois eliminam os riscos de autólise central causada por limitação difusional.

Na Figura 6.20 é mostrada a variação da concentração de metil paration com 12 h de tempo de detenção hidráulica e 0,5 g glicose/L.

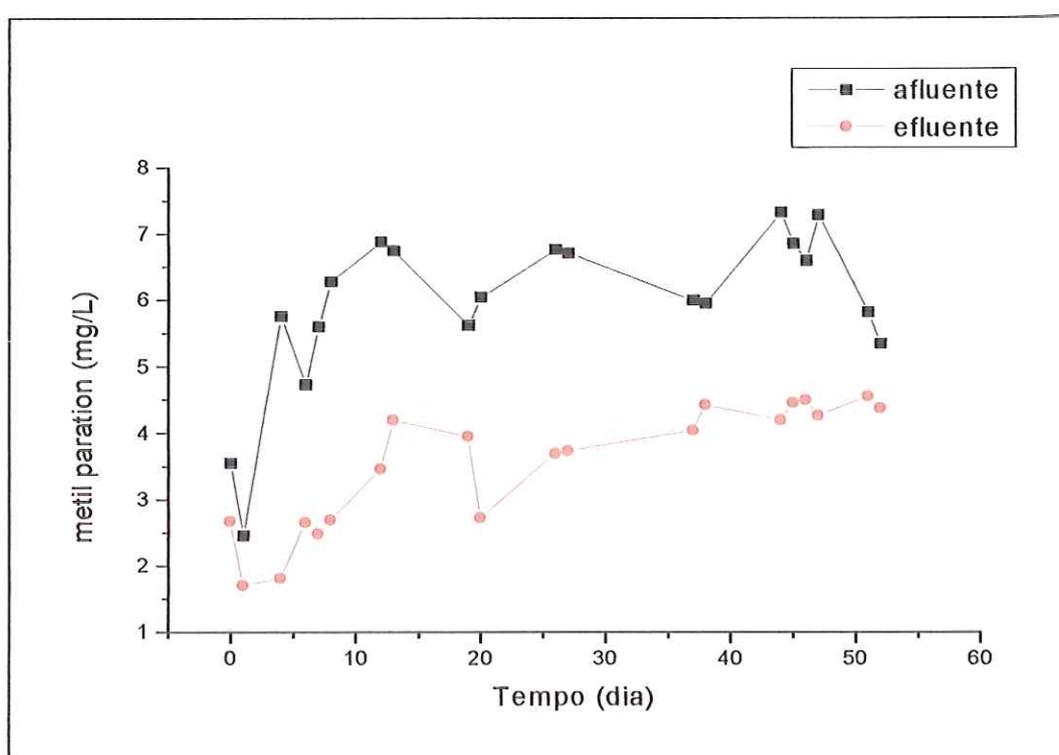


Figura 6.20 – Variação da concentração de metil paration com TDH de 12 h e 0,5 g de glicose/L

6.4.2 Segunda fase de operação após passagem do meio Sabouraud com tempo de detenção hidráulica de 12 h e 0,5 g glicose/L

A passagem do meio de cultura pelo reator, que tinha como objetivo formar maior quantidade de biofilme, não melhorou a remoção média do pesticida ficando esta, em $36 \pm 18 \%$. Para pH e condutividade, também não se observaram diferenças significativas com relação ao primeiro ciclo, pois o pH se manteve na faixa ácida e a condutividade também foi maior na saída dos reatores, porém mantendo baixos valores. Com relação à DQO o percentual de remoção passou de 47% (primeiro ciclo) para 49%.

Nas Figuras 6.21, 6.22, 6.23 e 6.24 são mostrados as variações de pH, condutividade, DQO e concentração de metil paration, respectivamente.

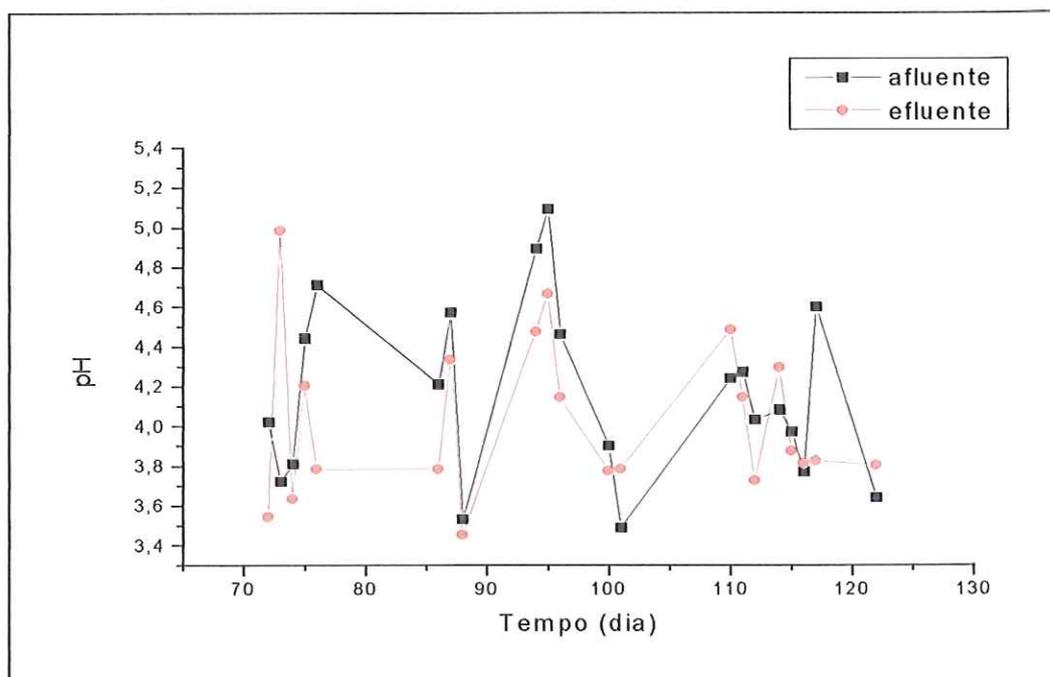


Figura 6.21 – Variação do pH com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L após alimentação com meio de cultura Sabouraud

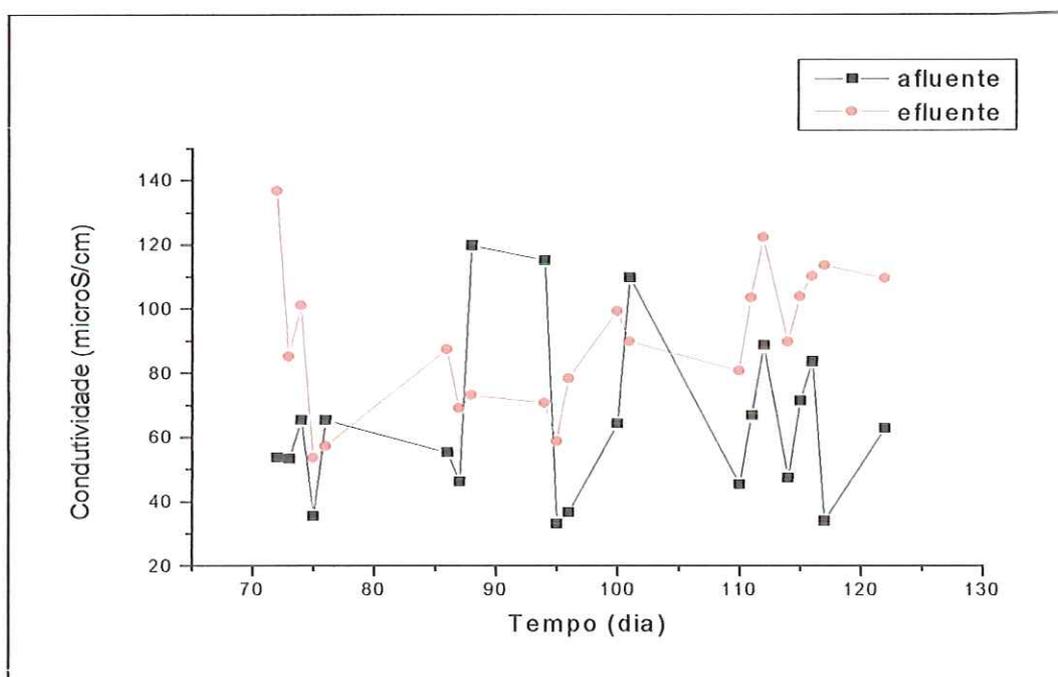


Figura 6.22 – Variação da condutividade com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L após alimentação com meio de cultura Sabouraud

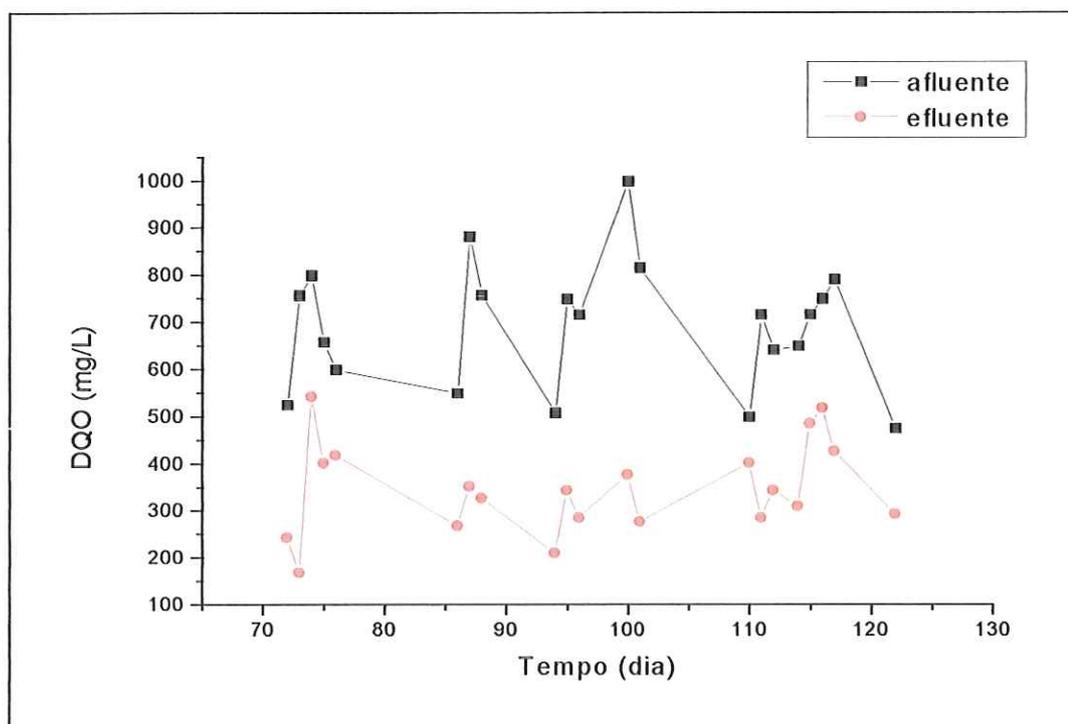


Figura 6.23 – Variação da DQO com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L após passagem pelo meio de cultura Sabouraud

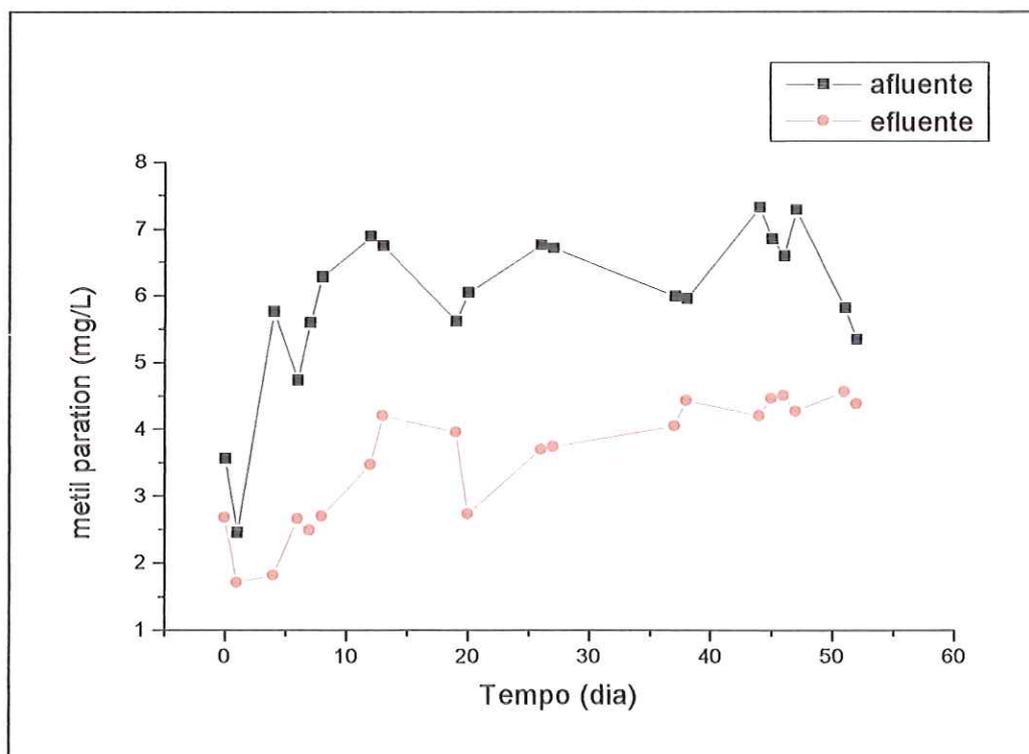


Figura 6.24 – Variação da concentração de metil paration com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L após passagem pelo meio de cultura Sabouraud

6.4.3 Terceira fase de operação com tempo de detenção hidráulica de 12 h e 1,0 g glicose/L

Nas Figuras 6.25, 6.26, 6.27 e 6.28 estão apresentadas as variações de pH, condutividade, concentração de metil paration e DQO, respectivamente.

A variação do pH se manteve na faixa ácida (3,6 a 4,9) como nos demais ciclos de operação e a condutividade oscilou de forma crescente entre o afluente ao reator e o efluente, mas mantendo-se em níveis baixos. Ou seja, as condições internas do reator com relação ao pH e à condutividade pouco diferenciaram da dos ciclos operados com TDH de 12 h e 0,5 g de glicose/L e após a passagem do meio de cultura Sabouraud.

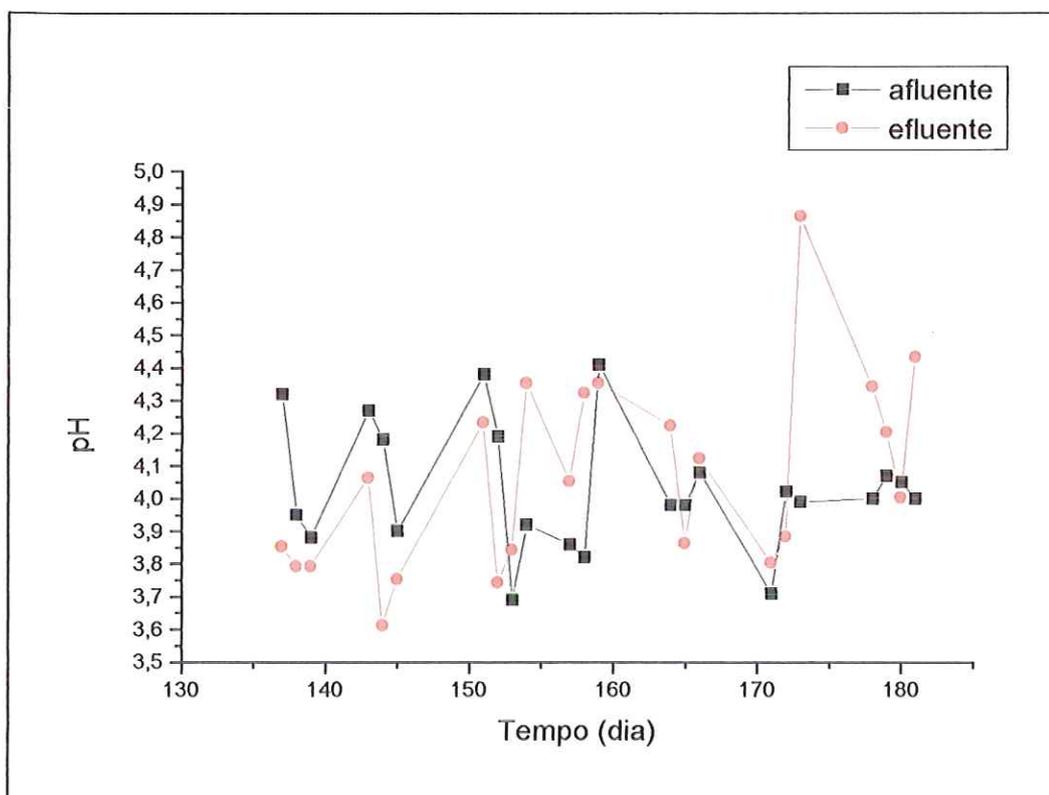


Figura 6.25 – Variação do pH com TDH de 12 h e 1,0 g glicose/L

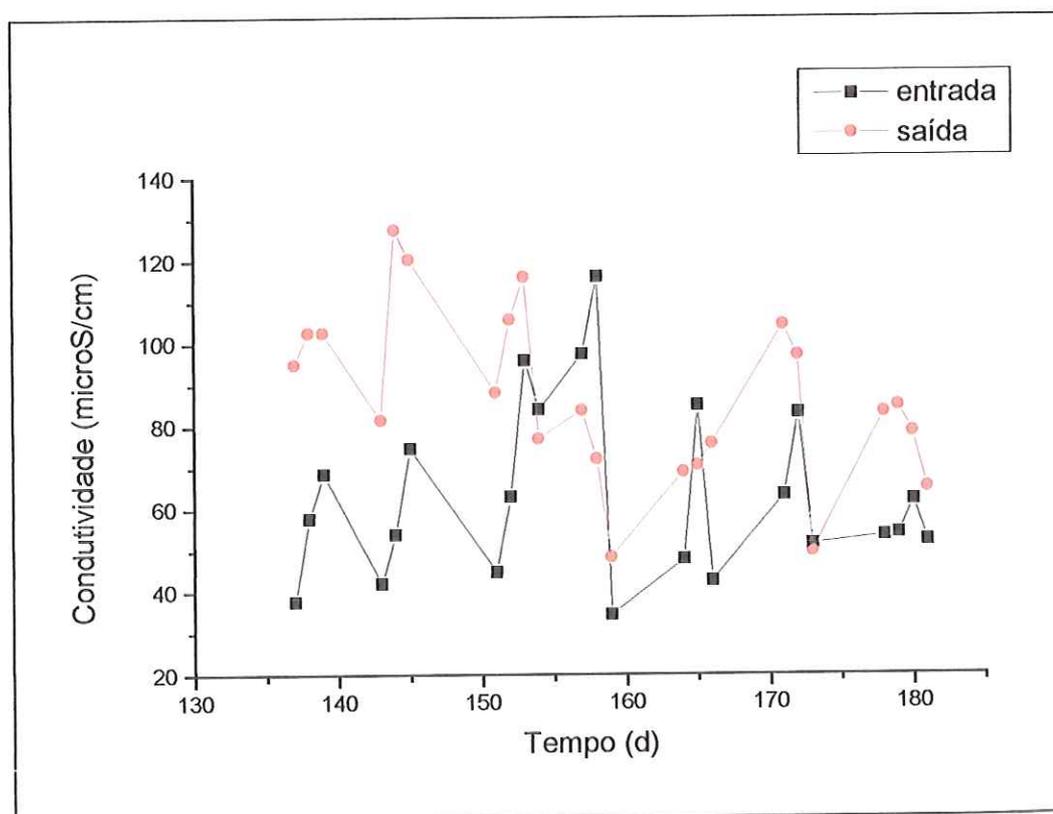


Figura 6.26 – Variação da condutividade com TDH de 12 h e 1,0 g glicose/L

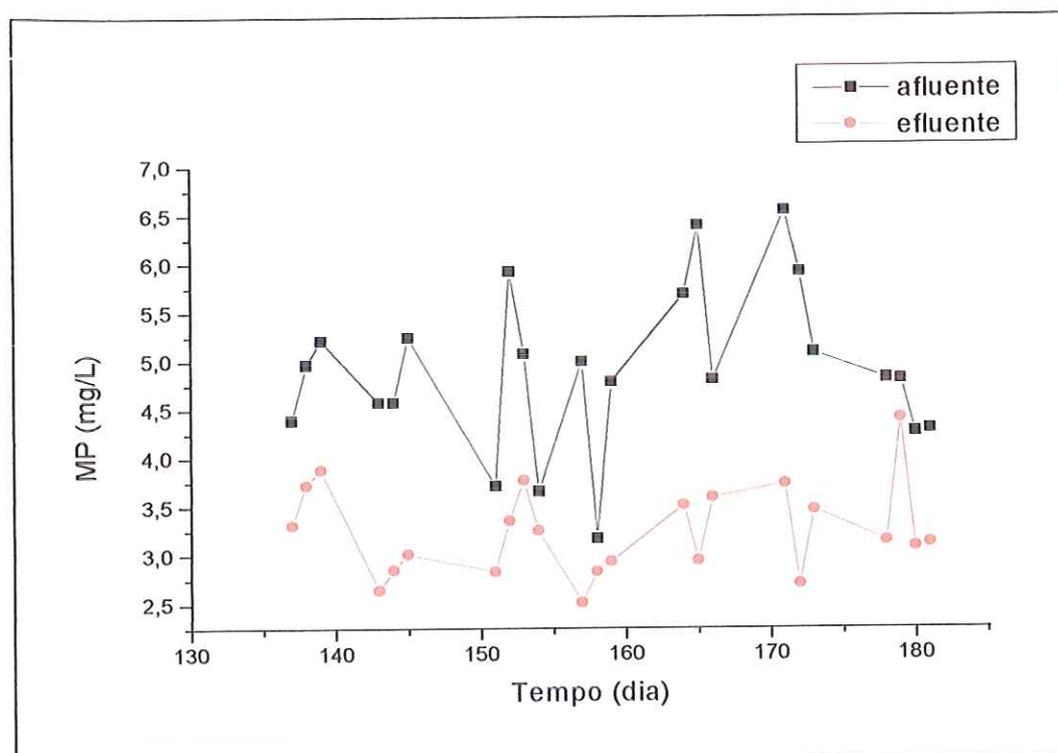


Figura 6.27 – Variação da concentração de metil paration com TDH de 12 h e 1,0 g de glicose/L

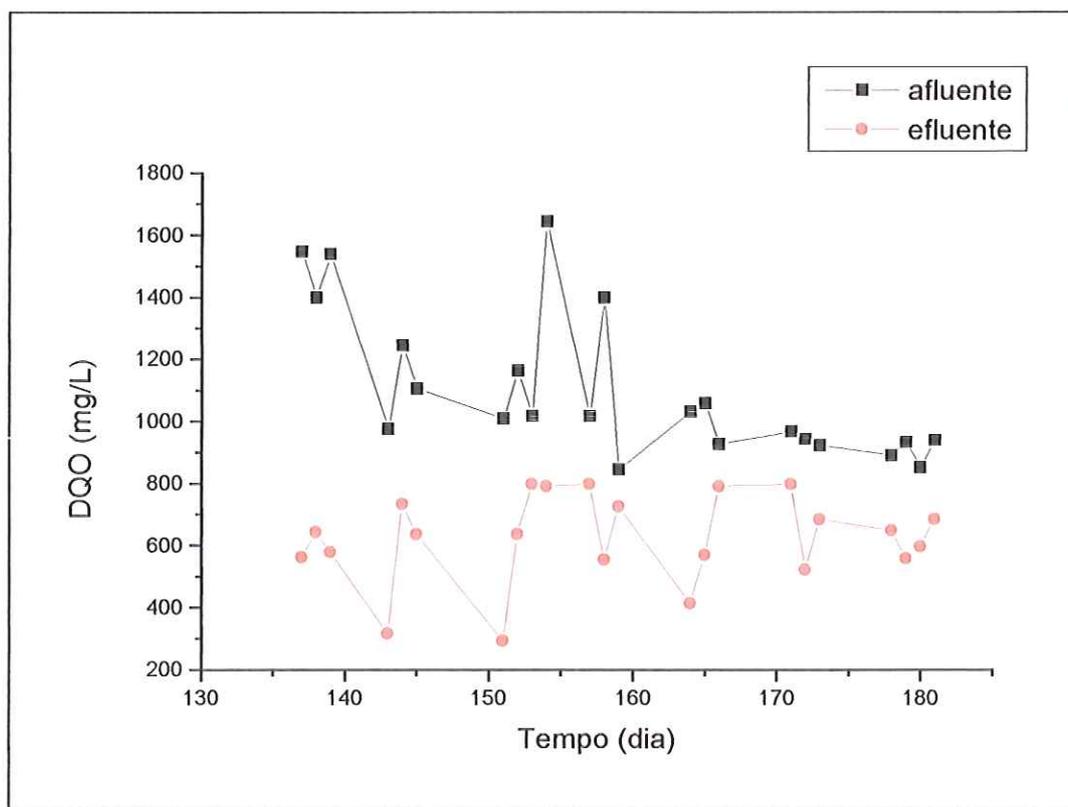


Figura 6.28 – Variação da DQO com TDH de 12 h e 1,0 g de glicose/L

Este ciclo de operação tinha como principal objetivo verificar a influência da concentração de glicose, na melhora de eficiência de remoção de metil paration. Desta forma, duplicou-se a quantidade do substrato primário e observou-se diminuição de 40% no primeiro ciclo para 36% no segundo ciclo e neste para 35%, mostrando que o aumento do substrato primário não provocou aumento da eficiência de remoção de metil paration. Ou seja, comparando as três condições impostas (0,5 g glicose/L; após passagem do meio de cultura Sabouraud e 1,0 g glicose/L) ao reator é clara a influência negativa de maior concentração de glicose com relação à remoção média de metil paration (Figura 6.29).

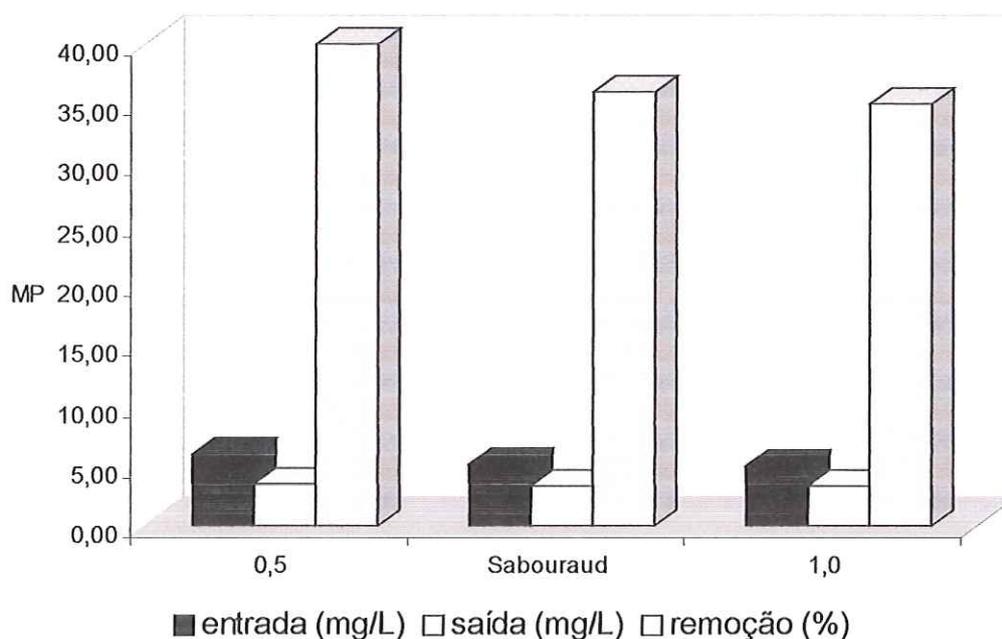


Figura 6.29 – Variação de metil paration no ciclo com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L; após passagem do meio de cultura Sabouraud com TDH de 12 h e 0,5 g glicose/L e com TDH de 12h 1,0 g glicose/L

Neste caso o aumento da concentração de glicose pode ter provocado maior crescimento das hifas e diminuído a remoção do pesticida, por limitação difusional, além de, provavelmente, ter dificultado a oxigenação dentro do reator. Percebeu-se claramente o crescimento exagerado da biomassa dentro do reator após o uso de 1 g glicose/L (Figuras 6.30 e 6.31). Segundo Moreira et al. (1996), uma das formas de controlar o crescimento exagerado em reatores de leito fixo, tem sido a aplicação de fluxo com pulso em frequência controlada, promovendo assim redução das restrições difusionais. Estes autores estudaram a aplicação de fluxo com pulso num reator de leito fluidizado para controlar a morfologia de fungos filamentosos, e verificaram que o controle do crescimento aumentou a produção enzimática das espécies *Aspergillus niger* e *Phanerochaete chrysosporium*, bem como a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Este controle de crescimento promove, principalmente, aumento da atividade superficial do micélio e melhor disponibilidade de oxigênio, bem como compactação do leito e conseqüente melhora da transferência de massa e conversão do substrato, o qual finaliza com aumento da produção no reator.



Figura 6.30 – Reator com 0,5 g glicose/L

Figura 6.31 – Reator com 1,0 g glicose/L

Outra hipótese é que os fungos preferiram utilizar a fonte mais fácil, no caso a glicose, em detrimento do pesticida. Papagianni e Matthey (2004) verificaram em seus estudos para produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* livre e imobilizado que, quando aumentavam a concentração de glicose de 50 g/L para 150 g/L, ocorria alterações na morfologia da biomassa formada. Com concentração de 50 g/L de glicose os filamentos formados eram longos e finos e com 150 g/L os filamentos eram grossos, curtos e inchados, o que levava a limitações difusionais.

7. CONCLUSÕES

A comunidade microbiológica formada, na fase do experimento, em batelada utilizando micélio fúngico, com predomínio da espécie fúngica *Aspergillus niger* nos reatores PF e PFG, e da espécie *Alternaria alternata* nos reatores de controle, mostrou-se viável ao tratamento biológico com fungos para remoção de metil paration de matrizes aquosas, alcançando percentuais de remoção de 93, 97 e 94% nos reatores de controle, PF e PFG, respectivamente.

A presença de glicose nos reatores PFG, ainda na fase com micélio fúngico, não influenciou a diminuição da concentração final de metil paration. Contudo, acelerou a degradação do organofosforado e o crescimento fúngico, que fez com que fossem obtidos valores menores de concentração de metil paration em tempos de reação menores.

Concentrações de até 60 mg/L de metil paration e de até 25 mg/L de atrazina não foram tóxicas para a espécie *Aspergillus niger* AN400, apesar de que, para estas concentrações, tenha sido necessário maior tempo de incubação.

A presença da glicose na concentração de 0,5 g/L, no ensaio com esporos de *Aspergillus niger* AN400 e metil paration, favoreceu melhores percentuais de remoção do poluente, quando comparada com os reatores que não continham o substrato primário. O melhor percentual de remoção de metil paration alcançado foi de 82%, no reator PFG1, cuja concentração inicial foi a menor desse grupo (0,62 mg/L). Portanto, a presença da glicose atuou em processo de co-metabolismo para remoção do inseticida.

O modelo cinético de primeira ordem representou bem a velocidade de decaimento do metil paration na fase com esporos, principalmente, nos reatores que continham glicose. Para os experimentos sem a adição de glicose, a constante cinética foi de $0,063 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$, enquanto que para os experimentos com glicose a constante foi de $0,162 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$. Dessa forma, a adição de glicose resultou efetivamente em aumento na velocidade de conversão do metil paration.

Nos reatores PFG, da fase com esporos, o crescimento celular não foi comprometido pelo aumento da concentração de metil paration, até 14,52 mg/L. Para a concentração de 24,89 mg/L houve diminuição do percentual de crescimento celular. Nos reatores PF, o percentual de crescimento celular diminuiu a medida em que a concentração de metil paration aumentou.

Na fase experimental com atrazina e esporos de *Aspergillus niger* AN400, a presença do substrato primário (glicose) não teve influência na remoção de atrazina, ficando os percentuais de remoção muito próximos aos percentuais encontrados nos reatores sem a glicose.

O estudo cinético, nessa fase com atrazina e esporos, revelou que para os experimentos sem a adição de glicose, o valor de R_{ATZ_0} foi $0,023 \text{ d}^{-1}$, enquanto que para os experimentos com glicose R_{ATZ_0} foi $0,022 \text{ d}^{-1}$. Dessa forma, a adição de glicose parece não ter influenciado significativamente a velocidade de remoção de atrazina.

O reator de leito fixo e fluxo ascendente removeu 40% de metil paration com tempo de detenção hidráulica de 12 h, tempo este, baixo quando comparado aos demais tempos de reação empregados nas fases de batelada que foram de 32 e 27 dias com micélio de fungos e esporos de *Aspergillus niger* AN400. Portanto, a operação com microrganismos imobilizados, parece ser mais eficiente na remoção de metil paration de água.

O aumento da concentração de glicose de 0,5 g/L para 1,0 g/L não exerceu nenhum efeito positivo sobre a remoção de metil paration no reator de leito fixo. Pelo contrário, o percentual remoção com 0,5 g de glicose/L foi de 40% e com 1,0 g de glicose/L o valor diminuiu para 35%.

A pesquisa demonstrou a potencialidade do uso de reatores com fungos no tratamento de águas contaminadas com metil paration e atrazina

8. RECOMENDAÇÕES

Testar o tempo de detenção hidráulica de 12 h sem glicose para remoção de metil paration em reatores de leito fixo e fluxo ascendente;

Testar os tempos de detenção hidráulica de 18 e 24 h, com e sem glicose, para remoção de metil paration em reatores de leito fixo e fluxo ascendente;

Estudar a eficiência de remoção de atrazina em reatores de leito fixo e fluxo ascendente, com e sem glicose, variando os tempos de detenção hidráulica;

Realizar ensaio de adsorção com carvão ativado e comparar os resultados com os do ensaio de adsorção com a manta agulhada de poliamida;

Testar outros tipos de meio suporte de baixo custo;

Estudar a eficiência de reatores em batelada e em fluxo contínuo para o tratamento de efluentes “in natura” de indústria agroquímica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-AGGELIS, G.; EHALIOTIS, C.; NERUD, F.; STOYCHEV, I.; LYBERATOS, G.; ZERVAKIS, G. I. (2002). *Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process*. Appl Microbiol Biotechnol, v. 59, pp. 353–360.

-APHA (1995). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18 ed Washington: American Public Health Association.

-ASKU, Z. (2005). *Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review*. Process Biochemistry, v. 40, pp. 997-1026.

-AYRANCI, E.; HODA, N. (2005). *Adsorption kinetics and isotherms of pesticides onto activated carbon-cloth*. Chemosphere, v. 10, pp.1-8.

-BEHKI, R. M.; KHAN, S. U. (1986). *Degradation by Pseudomonas: n-dealkilation and desalogenation of atrazine and its metabolites* J. Agric. Food Chem. v. 34, pp. 746-749.

-BELTRAN, F. J.; GARCIA-ARAYA, J. F.; ALVAREZ, P. M.; RIVAS, J. (1998). *Aqueous degradation of atrazine and some of its main by-products with ozone/hydrogen peroxide*. Journal Chemical Technology Biotechnology, v. 71, pp. 345-355.

-BENDING, G. D.; FRILOUX, M.; WALKER, A. (2002). *Degradation of contrasting pesticides by white hot fungi and its with ligninolytic potencial*. FEMS Microbiology Letters, v. 212, pp. 59-63.

-BENNET, J. W.; WUNCH, K. G.; FAISON, B. D. (2002). *Environmental Microbiology*. Second Edition, ASM Press Washington, D. C.

-BENNO, A. I.; RUUD, C. J. VD.; ROB, J. V.; HANS, G. J. M.; ODILE, M. S. (2001). *Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous samples by direct*

injection using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography, v. 918, pp. 67-78.

-BLANQUEZ, P.; CAMINAL, G.; SARRA, M.; VICENT, M. T.; GABARRELL, X. (2002). Olive oil mill waste waters decoloration and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *phanerochaete flavidio-alba*. Biotechnol. Prog., v. 18, pp. 660-662.

-BICHAT, F.; SIMS, G. K.; MULVANEY, R. L. (1999). *Microbial utilization of heterocyclic nitrogen from atrazin*. Soil Sci. Soc. Amer. J. v. 63, pp. 100-110.

-BITTON, GABRIEL (1994). *Wastewater microbiology*. New York, 17-19p.

-BOLLAG, J. M.; CHU, H.L.; RAO, M. A.; GIANFREDA, L. *Enzymatic Oxidative Transformation of Chlorophenol Mixtures* (2003). J. Environ. Qual., v. 32, pp. 63–69.

-BOUSSAHEL, R.; BOULAND, S.; MOUSSAOUI, K. M.; MONTIEL, A. (2000). *Removal of pesticides residues in water using the nanofiltration process*. Desalination, v. 132, pp. 205-209.

-BRASIL (2004). Portaria N° 518 do Ministério da Saúde de 25/03/2004.

-BRASIL (2005). Conselho Nacional Do Meio Ambiente – CONAMA - Resolução N° 357 de 17 de março de 2005, Classificação das águas doces, salobras e salinas do Território nacional. *Diário Oficial da União*, Brasília Seção 1, pp. 58-63.

-BRUCE, C. A.; BRUCE, E. L.; ROBERT, L.G. (1995). *Degradation of pentachlorophenol by fixed films of white rot fungi in rotating tube bioreactors*. Water Research, v. 29, pp. 61-67.

-CAMPOS, C. S.; BAUDIN, M. B.; LAINE, JM. (2000). *Atrazine removal by powdered activated carbon in floc blanket reactors*. Water Research, v. 34, pp. 4070-4080.

-CHAN, C. Y.; TAO, S.; DAWSON, R.; WONG, P. K. (2004). *Treatment of atrazine by integrating photocatalytic and biological processes*. Environmental Pollution v. 1 pp. 45-54.

-CHENG, S.; CIFREK, Z. V.; GROSSE, W.; KARRENBROCK, F. (2002). *Xenobiotics removal from polluted water by a multifunctional constructed wetland*. Chemosphere, v. 48, pp. 415-418.

-CORAL, G.; ARIKAN, B.; ALDI, M. N.; GUVENMEZ, H. (2002). *Some properties of crude carboxymethyl cellulase of Aspergillus niger Z10 wild-type strain*. Turk J. Biol., v. 26, pp. 209-213.

-CUBAS, S. A.; FORESTI, E.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; ZAIAT, M. (2004). *Influence of liquid-phase mass transfer on the performance of a stirred anaerobic sequencing batch reactor containing immobilized biomass*. Biochemical Engineering Journal, v. 17, pp. 99-105.

-D'ANNIBALE, A.; CRESTINI, C.; VINCIGUERRA, V.; SERMANNI, G. G. (1998). *The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus*. Journal of Biotechnology, v. 61, pp. 209-218

-DIAS, A. A.; BEZERRA, R. M.; PEREIRA, A. N. (2004). *Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater*. Bioresource Technology, v. 92, pp. 7-13.

-DÁVILA-VAZQUEZ, G.; TINOCO, R.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. (2005). *Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from Bjerkandera aduata*. Enzyme and Microbial Technology, v. 36, pp. 223-231.

-DENIZLI, A.; CIHANGIR, N.; YOUSEFI RAD, A.; TANER, M.; GÜLEREN, A. (2004) *Removal of chlorophenols from synthetic solutions using Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry, v. 39, pp. 2025-2030.

-DENIZLI, A.; CIHANGIR, N.; TEUZMEN, N.; ALSANCAK, G. (2005) *Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus Pleurotus sajor caju*. Bioresource Technology, v.96, pp. 59-62.

-DI PALMA, L.; FERRANTELLI, P.; PETRUCCI, E. *Experimental study of the remediation of atrazine contaminated soils through soil extraction and subsequent peroxidation* (2003). Journal of Hazardous Materials, v. 99, pp. 265-276.

-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (2003). *Ambient aquatic life water quality criteria for atrazine – revised draft*.

-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1991). *Memorandum from the Office of Pesticides and Toxic Substances to Office of Pesticide Programs Division Director*, Washington, DC, 5-6

- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997). *Aspergillus niger Final Risk Assessment* – Biothechnology Program Under Toxic.
- ERICKSON, L. E.; LEE, K. H. (1989). *Degradation of atrazine and related s-triazines*. Crit Rev Environ Control., v. 19, pp. 1-14.
- FACÓ, A. M.; SANTAELLA, S. T.; SAMPAIO, G. M. M. S.; SANTOS, E. M. A. (2003). *Tratamento biológico de percolado de aterro sanitário através de processo biológico com fungos*. III Encontro de pesquisa e pós-graduação do CEFET, Fortaleza-CE- Brasil.
- FEAKIN, S. J.; BLACKBURN, E.; BURNS, R. G. (1994). *Biodegradation os s-triazine herbicides at low concentrations in surface waters*. Water Research, v. 28, pp. 2289-2296.
- FITZ-GIBBON, F.; SINGH, D.; McMULLAN, G.; MARCHANT, R. (1998) *The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration of distillery wastewater remediation by fungi*. Process Biochemistry, v. 33, pp. 799-803.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde (2002). *Vigilância Epidemiológica de doenças e agravos específicos – intoxicações por agrotóxicos*. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/public>> Acesso em: 15 de junho de 2003.
- FUNGARO, A.; SILVA, C. (2000). *Utilização de zeólito a partir de cinza residual de carvão*. Química Nova, v. 25, pp. 1280-1285.
- GARCIA, I. G., PEÑA, P. R. J., VENCESLADA, J. L. B., MARTIN, A. M., MARTIN, M. A. S., GÓMEZ, E. R. (2000). *Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using Phanerochaete chrysosporium, Aspergillus niger, Aspergillus terreus and Geotrichum candidum*. Process Biochemistry, v. 35, pp. 751 – 758.
- GHAUCH, A., RIMA, J., AMINE, C., MARTIN-BOUYER, M. (2000). *Rapid treatment of water contaminated with atrazine and parathion with zero-valent iron*. Chemosphere, v. 41, pp. 1835-1843.
- GHAUCH, A.; SUPTIL, J. (1999). *Remediation of s-triazines contaminated water in a laboratory scale apparatus using zero-valent iron powder*. Chemosphere, v. 39, pp. 1309-1315.

-GHOSH, P. K.; PHILIP, L. (2004). *Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium*. Water Research, v. 38, pp. 2277-2284.

-GIFFONI, D. A. (2000). *Filtros Biológicos aplicado ao tratamento de água residuária sintética de laticínios*. Fortaleza. 159p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil, área de concentração em Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará).

-GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; MURAD, F. (1987). *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro, ed. Guanabara, 1195p.

-GRIFFIN, D. H. (1994). *Fungal physiology*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 458p.

-GU, JG.; FAN, Y.; GU, FD. (2003). *Biodegradability of atrazine, cyanazine e dicamba under methanogenic condition in three soils of China*. Chemosphere, v. 52, pp. 1515-1521.

-GUPTA, A.; KAUSHIK, C. P.; KAUSHIK, A. (2000). *Degradation of hexachlorocyclohexana (HCH; α , β , γ e δ) by Bacillus circulans and Bacillus brevis isolated from soil contaminated with HCH*. Soil Biology & Biochemistry, v. 32, pp. 1803-1805.

-GUPTA, P. K. (2004). *Pesticide exposure – Indian scene*. Toxicology, v. 198, pp. 83-90.

-HERNANDEZ, J.; ROBLETO, NR; VELASCO, L.; QUINTERO, R.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. (1998). *Chloroperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides*. Pesticides Biochemistry and Fhisiology, v. 61, pp. 87-94.

-HISTÓRIA DOS AGROTÓXICOS. Disponível em:
<<http://www.planetaorgânico.com.br/agohist1.htm>> Acesso em: 12 de fevereiro de 2005.

- INTERNATIONAL PROGRAMME OF CHEMICAL SAFETY (IPCS) – *Health and Safety Guide* (1992) – No. 75, World Health Organization, Geneva.

- INTERNATIONAL PROGRAMME OF CHEMICAL SAFETY (IPCS) – *Health and Safety Guide* (1992) – No. 47, World Health Organization, Geneva.

-JAVARONI, RC. A.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, MO. O. (1999). *Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar*. Química Nova, v. 22, pp. 43-51.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S. (1999). *The descolorization of a chemical industry effluent by white rot fungi*. Water Research, v. 33, pp. 575-577.

-KAPDAN, I. K.; KARGI, F. (2002). *Biological descolorization of textile dyestuff containing waterwater by Coriolus versicolor in rotating biological contactor*. Enzyme and Microbial Technology, v. 30, pp. 195-199.

-KATZ, I.; DOSORETZ, C. G.; MANDELBAUM, R. T.; GREEN, M. (2001). *Atrazine degradation under denitrifying conditions in continuous culture of Pseudomonas ADP*. Water Research, v. 35, pp. 3272-3275.

-KAUFFMANN, C.; B.R. PETERSEN, B.R.; BJERRUM, MORTEN J. (1999). *Enzymatic removal of phenols from aqueous solutions by Coprinus cinereus peroxidase and hydrogen peroxide*. Journal of Biotechnology, v.73, pp.71-74.

-KIM, S. J.; SHODA, M. (1999). *Descolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus Geotrichum candidum Dec 1*. Institute of Technology, Japan.

-KONSTANTINOOU, I.; ALBANIS, T.; PETRAKIS, D.; POMONIS, P. (2000). *Removal of herbicides from aqueous solutions by adsorption on Al-pillared clays, Fe-Al pillared clays and mesoporous alumina aluminum phosphates*. Water Research, v. 34, pp. 3123-3136.

-KRÝSOVÁ, H.; JIRKOVSKÝ, J.; KRÝSA, J.; MAILHOT, G.; BOLTE, M. (2003). *Comparative kinetic study of atrazine photodegradation in aqueous $Fe(ClO_4)_3$ solutions and TiO_2 suspensions*. Applied Catalysis B: Environmental, v. 40, pp. 1-12.

-KYRIAKOPOULOS, G.; DOULIA, D.; ANAGNOSTOPOULOS, E. (2005). *Adsorption of pesticides on porous polymeric adsorbents*. Chemical Engineering Science, v. 60, pp. 1177-1186.

-LONDOÑO, D. K.; SIEGFRIELD, B. D.; LYDY, M. J.; (2004). *Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in Chironomus tentans (Diptera: Chironomidae)*. Chemosphere, v. 45, pp. 234-242.

-LUCHINI, L. C.; PERES, T. B.; REZENDE, M. O. DE O. (1999). *Degradation of the insecticide parathion in metanol by gamma-irradiation*. Journal of Radionalytical and Nuclear Chemistry, v. 241, pp. 191-194.

- LUCHINI, L. C.; LANDGRAF, M. D.; VIEIRA, E. M.; REZENDE, M. O. DE O. (1996). *Estudo da degradação do inseticida paration através da radiação gama do cobalto-60*. Química Nova, v. 19, pp. 353-356.

-MA, T.; CHAMBERS, J. E. (1994). *Kinetics parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpiryfos by rat liver microsomes*. Food Chem. Toxicol., v. 32, pp. 763.

-MA, J.; GRAHAM, N. J. D. (1997). *Preliminary investigation of manganese-catalysed ozonation for the destruction of atrazine*. Ozone Sci. Engen., v. 19, pp. 227-240.

-MA, J.; GRAHAM, N. J. D. (1998). *Degradation of atrazine by manganese-catalysed ozonation-influence of humic substances*. Water Research, v. 33, pp. 785-793.

-MA, J.; GRAHAM, N. J. D. (2000). *Degradation of atrazine by manganese-catalysed ozonation-influence of radical scavengers*. Water Research, v. 34, pp. 3822-3828.

-MACÊDO, J. A. B. (2002). *Introdução à Química Ambiental – Química & Meio Ambiente & Sociedade*. Juiz de Fora – MG, 1ª ed., 487p.

-MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, B. H.; WACKETT, L. P. (1995). *Isolation of a Pseudomonas sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine*. Appl. Environ. Microbiol., v. 61, pp. 1451-1457.

-MANDELBAUM, R. T.; WACKETT, L. P.; ALLAN, D. L. (1993). *Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures*. Appl. Environ. Microbiol. v. 59, pp. 1695-1701.

-MARTÍN-GULLÓN, I.; FONT, R. (2000). *Dynamic pesticide removal with activated carbon fibers*. Water Research, v. 35, pp. 516-520.

- MARTINARI, L.; GIARDINA, P.; MARZULLO, L.; SANNIA, G. (1996). *Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus pleurotus ostreatus*. Water Research, v. 30, pp. 1914-1918.

- MASAPHY, S.; HENIS, Y.; KRINFELD, B.; LEVANON, D. (1997). *In-vitro N-de-ethylation of atrazina by cell-free extract of Pleurotus pulmonaris is induced by Mn²⁺*. Biotechnology Letters, v. 19, pp. 861-864.
- MARQUARDT, D.W. (1963). *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. J. Soc. Indust. Appl. Math., 11, 431-441.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (1997). *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 211-291p.
- MOREIRA, M. T.; SANROMÁN, A; FEIJOO, G. LEMA, J. M. (1996). *Control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactor by means of a pulsing flow. Application to Aspergillus niger and Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme and Microbial Technology, v. 19, pp. 261-266.
- OLIVEIRA, E. C.; SANTAELLA, S. T.; FÉLIX, J. P. L.; LEITÃO, R. C.; MELO, V. M. M. (2004). *Phenol degradation by fungi present in oilrefinery wastewaters*. VII Simposio Internazionale di Ingegneria Sanitaria Ambientale. Taormina – Itália.
- PAIVA, J. B.; ADAMI, A. M. (2002). *Toxicologia*. Disponível em <<http://www.farmacia.med.br/toxicologi.htm>> Acesso em: 24 de novembro de 2004.
- PAL, O. R.; VANJARA, A. K. (2001). *Removal of malathion and butachlor from aqueous solution by clays and organoclays*. Separation and Purification Technology, v. 24, pp. 167-172.
- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. (2004). *Physiological aspects of free and immobilized Aspergillus niger cultures producing citric acid under various glucose concentrations*. Process Biochemistry, v. 39, pp. 1967-1970.
- PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. (2002). *Protease secretion in glucoaylase producer Aspergillus niger cultures: fungal morphology and inoculum effects*. Process Biochemistry, v. 37, pp. 1271-1278.
- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M.; KRISTIANSSEN, B.; (1999). *The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of Aspergillus niger in batch and culture*. Process Biochemistry, v. 25, pp. 710-717.
- PASHOVA, S.; SLOKOSKA, L.; SHEREMETSKA, P.; KRUMOVA, E.; VASILEVA, L. ANGELOVA, M. (1999). *Physiological aspects of immobilized*

Aspergillus niger cells producing polymethylgalacturonase. *Process Biochemistry*, v. 35, pp. 15-19,

-PELCZAR, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. (1996). *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2^a ed. São Paulo: McGraw-Hill, v. I, 517p.

-PRENAFETA BOLDÚ, F. X. (2002). *Growth of on aromatic hydrocarbons: Environmental technology perspectives*. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

-PROTZMAN, RS.; LEE, P. H.; ONG, S. K.; MOORMAN, T. B. (1999). *Treatment of formulated atrazine rinsate by Agrobacterium radiobacter strain J14A in a sequencing batch biofilm reactor*. *Wat. Res.* v. 33, pp. 1399-1404.

-RAO, J. R.; VIRARAGHAVAN, T. (2002). *Biosorption of phenol from an aqueous solution by Aspergillus niger biomass*. *Bioresource Technology*, v. 85, pp. 165–171.

-RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. (1998) *Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases*. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 6, pp. 597–635.

-RELATÓRIO TÉCNICO (2000) - *Distribuição de vendas*. AGRYPEC - Química e Farmacêutica S/A.

-RITTER, W. F. (1990). *Pesticide contamination of ground water in the United State*. *Journal Environ. Sci. Health* v. 15 pp. 1-29.

-ROBLES, A.; LUCAS, R.; DE CIENFUEGOS, G. A.; G_ ALVEZ, A. (2000). *Biomass production and detoxication of wastewaters from the olive oil industry by strains of Penicillium isolated from wastewater disposal ponds*. *Bioresource Technology*, v. 74, pp. 217-221.

-RODRIGUES, K. A.; ZAIAT, M.; SAMPAIO, G. M. M. S.; SANTAELLA, S. T. (2004). *Redução da concentração de fenol em água residuária sintética em reatores biológicos com fungos*. VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. CD rom. Natal – RN.

-RODRIGUES, K. A., SANTAELLA, S. T. (2003). *Remoção de DQO por biodegradação fúngica em água residuária sintética de laticínios*. In: WETLAND, E.,

SCHALCH, V. Pesquisas em meio ambiente: subsídios para gestão de políticas públicas, v. 2, São Carlos: Rima.

-SÁ, I.M.B. (1997). *Biotratamento de efluente de uma indústria de laticínios por ação de fungos decompositores*. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 83p.

-SALTIMIRAS, D. A.; LEMLEY, (2002). A. T. *Atrazine degradation by anodic Fenton treatment*. Water Research, v. 36, pp. 5113-5119.

-SAMPAIO, G. M. M. S., SANTOS, E. A., FACÓ, A. M., LEITÃO, R. C., MENEZES, E. A., SANTAELLA, S. T. (2004). *Pós-Tratamento de efluente de um reator UASB através de um reator biológico com fungos*. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, v.9, n.1, p.73-81, jan./mar.

-SANTAELLA, S. T. (1997). *Estudos de tecnologias apropriadas para tratamento de efluentes da indústria de castanha de caju*. Fortaleza: UFC, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, 31p. (Relatório Institucional de Pesquisa).

-SANTAELLA, S. T. (1999). *Estudos de tecnologias apropriadas para tratamento de efluentes da indústria de castanha de caju*. Fortaleza: UFC, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, 31p. (Relatório Institucional de Pesquisa).

-SANTOS, E. M. A.; SANTAELLA, S. T.; SAMPAIO, G. M. M. S. FACÓ, A. M. (2003). *Influência do tempo de detenção hidráulica de um sistema constituído por um reator UASB seguido por um reator biológico com fungos para tratar efluentes de indústria de castanha de caju*. III Encontro de pesquisa e pós-graduação – CEFET – CE, Fortaleza.

-SANTOS, F. F.; REZENDE, M. O. DE O. (1999). *Degradação acelerada do inseticida paration etílico utilizando radiação ultravioleta na presença de ácido húmico*. Anais Associação Brasileira de Química, v. 48, pp. 86-91.

-SANTOS, F. F.; REZENDE, M. O. DE O. (2002). *Influência do meio reacional no comportamento fitoquímico do inseticida parathion etílico*. Química Nova, v. 25, pp. 53-58.

-SCHARF, M. E.; SIEGFRIED, B. D.; MEINKE, L. J.; WRIGHT, R. J.; CHANDLER, L. D. (2000). *Cytochrome P450-mediated N-demethylation activity and induction in insecticide-resistant and susceptible western corn rootworm population (Coleoptera: Chrysomelidae)*. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 37, pp. 137-143.

-SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA (2002). Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>> Acesso em 17 de abril de 2003.

-SINGH, P.; SURI, C. R.; CAMEOTRA, S. S. (2004). *Isolation of a member of Acinetobacter species involved in atrazine degradation*. Bichemicaland Biophysical Research Communications, v. 317, pp. 697-702.

-SINGH, N.; MEGHARAJ, M.; KOOKANA, R. S.; NAIDU, R. (2004). *Atrazine and simazine degradation in Pennisetum rhizosphere*. Chemosphere, v. 31, pp. 67-72.

-STEVENS, J. T. AND SUMNER, D. D. (1991). *Herbicides*. In Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., Eds. Academic Press, New York, NY, 8-4.

-SUDO, M.; KUNIMATSU, T.; OKUDO, T. (2002). *Concentration and loading of pesticide residues in Lake Biwa basin (Japan)*. Water Research, v. 36, pp 315-329.

-TOPP, E.; MULBRY, W. M.; ZHU, H.; NOUR, S. M.; CUPPELS, D. (2000). *Characterization of s-triazine herbicide metabolism by Nocardioides sp. isolated from agricultural soils*. Appl. Environ. Microbiol., v. 66, pp. 3134-3141.

-TRABUSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMTERTZ, O. SCANDEIAS, J. A. N. (1999). *Microbiologia*. São Paulo. Editora Ateneu, 3ed. 588p

-TSIOULPAS, A.; DIMOU, D.; ICONOMOU B, D.; AGGELIS, G. (2002). *Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of Pleurotus spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity*. Bioresource Technology, v. 84, pp. 251-25.

-UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. Disponível em:<http://biotecnologia.com.br/bio/10_i.htm> Acesso em: 6 de outubro de 2002.

-VASSILEV, N.; FENICE, M.; FEDERICI, F.; AZCON, R. (1997). *Olive mill waste water treatment by immobilized cells os Aspergillus niger and its enrichment with soluble phosphate*. Process Biochemistry, v. 32, pp. 617-620.

-VICINGUERRA, V.; D'ANNIBALE, A.; GACS-BAITZ, E.; DELLE MONACHE, G. GIOVANNOZZI SERMA, G. (1995). *Correlated effects during bioconversion of waste olive mater by *Lenitula edodes**. *Bioresource Technology*, v. 51, pp. 221-226.

-VIRARAGHAVAN, T.; FU, Y. (2002). *Removal of Congo Red from an aqueous solutions by fungus *aspergillus niger** (2002). *Advances in Environmental Research*, v. 7, pp. 239-247.

-VOLKE-SEPULVEDA, T. L.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; FAVELA-TORRES, E. (2003). *Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger**. *Bioresource Technology*, v. 87, pp. 81-86.

-YANZE-KONTCHOU, C.; GSCHWIND, N. (1999). *Mineralization of the herbicide atrazine in soil inoculated with a *Pseudomonas strin**. *J. Agricul. Food Chem.*, v. 43, pp. 2291-2294.

-YASSIR, A.; LAGACHERIE, B.; HOUOT, S.; SOULAS, G. (1999). *Microbial aspects of atrazine biodegradation in relation to history of soil treatment*. *Pestic. Sci.*, v. 55, pp. 799-809.

-WITTEVEEN, COR F. B. (1993). *Gluconato formation and polyol metabolism in *Aspergillus niger** Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

-ZHANG, F. M.; KNAPP, J. S.; TAPLEY, K. N. (1999). *Descolourization of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus*. *Water Research*, v. 33, pp. 919-928.