



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EDNALDO RAMOS DOS SANTOS

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E QUITOSANA POR *CUNNINGHAMELLA*
***ELEGANS* UCP/WFCC 0542 E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE**
CROMO

Recife - PE
2013

EDNALDO RAMOS DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E QUITOSANA POR *CUNNINGHAMELLA*
ELEGANS UCP/WFCC 0542 E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE
CROMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisitos do título **Doutor em Ciências Biológicas**.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Co-Orientadores: Profa. Dra. Kaoru Okada
Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Recife - PE
2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Ednaldo Ramos dos

Produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 e aplicação na remoção de cromo/ Ednaldo Ramos dos Santos– Recife: O Autor, 2013.

149 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos Takaki

Coorientadores: Kaoru Okada e Everaldo Silvino dos Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. FUNGOS 2. RESÍDUOS 3. BIOMASSA I. TAKAKI, GALBA MARIA DE CAMPOS (ORIENTADORA) II. OKADA, KAORU (COORIENTADOR) III. SANTOS, EVERALDO SILVINO DOS (COORIENTADOR) IV. TÍTULO**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 214

Ednaldo Ramos dos Santos

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA E QUITOSANA POR *CUNNINGHAMELLA ELEGANS*
UCP/WFCC 0542 E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE CROMO**

Tese apresentada a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração: Biotecnologia, para obtenção do título Doutor.

Banca examinadora

Profª. Dra. Galba Maria de Campos Takaki – Orientadora
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profª. Dra. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profª. Dra. Thayza Christina de M. Stamford
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profª. Dra. Hέλvia Walewska Casullo de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba-UEPB

Recife – PE
2013

Homenagem especial

*Este trabalho dedico a vocês
Meu pai, Oreste Sebastião dos Santos
(In memória) e minha mãe, Lindaura Ramos Barreto dos Santos,
que sabiamente me educou e incentivou para esta conquista*

À minha esposa,
Maria Cristiane dos Santos
e aos meus filhos Vanessa, Mayra e Albertim,
pela compreensão silenciosa e inocente nos momentos
de ausência, para que eu pudesse realizar este grande sonho

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela realização desta grande conquista e sonho.

À Prof^a Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki, pelos momentos de aprendizagem, compreensão, competência e ética durante toda orientação; à Prof^a Dr^a. Kaoru Okada, pelo sua ajuda e colaboração; Ao Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos pela colaboração e compreensão.

Aos professores do curso de doutorado em Ciências Biológicas, pela dedicação e palavras de incentivo no transcorrer de nossa convivência.

Aos colegas de turma do doutorado, pelos momentos de aprendizagem e descontração.

À Adenilda secretária da pós-graduação do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE; à Sônia Maria de Souza, secretária do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais – NPCIAMB – UNICAP, pela gentileza dispensada e aos técnicos: Severino Humberto de Almeida e André Filipe, pela colaboração durante o período de desenvolvimento da pesquisa.

Aos magníficos Reitores da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado e Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, por proporcionar as condições essenciais para a edificação do conhecimento e concretização desta pesquisa.

Aos professores durante o período do doutorado sanduíche no exterior Universidade do Minho em Portugal, Dr. Nelson Lima, pela co-orientação e acolhida, a Prof^a Dr^a Teresa Tavares pela orientação no desenvolvimento da pesquisa e o incentivo do Prof. Dr. Cledir Santos,

Às instituições de fomento à pesquisa: FACEPE, pelo suporte financeiro para realização desta etapa acadêmica, e ao CNPq, por haver proporcionado o suporte financeiro para doutorado sanduíche com a Universidade do Minho – Portugal.

A todos os amigos que torceram por mim e que ajudaram nesta caminhada com palavras de conforto incentivo em especial aos doutorandos Rosineide Frontinelle, Roberto Albuquerque de Lima e ao mestre Marcos Antônio Cavalcanti Luna.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 METAIS PESADOS E O MEIO AMBIENTE.....	16
3.1.1 Metais pesados	16
3.1.2 Cromo	16
3.1.3 Reciclagem do Cromo	18
3.1.4 Cromo no Ambiente	19
3.1.5 Toxicidade do Cromo	21
3.1.6 Sorbente x Remoção de Cromo.....	21
3.2 INDÚSTRIA DE CURTUME: ASPECTOS GERAIS	24
3.2.1 Histórico do Beneficiamento do Couro	24
3.2.2 Indústria de Curtimento do Couro: aspectos gerais.....	25
3.2.3 Processamento do Couro.....	26
3.2.4 Couro: produto nobre e de importância econômica	28
3.2.6 Impactos Ambientais na Produção de Couro	30
3.2.7 Caracterização do Efluente de Curtume	32
3.2.8 Tratamentos de Efluente da Indústria de Couro.....	34
3.2.8.1 Tratamento Físico-Químico	34

3.2.8.2 Processos de biorremocão de metal pesado	37
3.2.9 Indústria de Curtume e a Legislação Ambiental	41
3.3 MICRO-ORGANISMO SELECIONADO E SUBSTRATO ALTERNATIVO.....	43
3.3.1 MICRO-ORGANISMO SELECIONADO: <i>Cunninghamella elegans</i>	43
3.3.2 Substrato Agroindustrial Alternativo: Milhocina.....	46
4. Referências Bibliográficas.....	49
CAPÍTULO 2	64
Suplementação abundante de aminoácidos no aumento da produção de biomassa e quitosana por <i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542 em fermentação submersa.....	65
Resumo.....	65
1. Introdução.....	66
2. Resultados e Discussão	67
3. Seção Experimental.....	73
4. Conclusões.....	76
5. Referências Bibliográficas.....	77
CAPÍTULO 3	81
Kinetic model in batch system for removal of hexavalent chromium by <i>Cunninghamella elegans</i> UCP / WFCC 0542.....	82
1 Introduction	83
2. Materials and Methods.....	84
3. Results and discussion.....	87
4. Conclusions	94
5. References	95
CAPÍTULO 4	98
Tratamento de efluente de indústria de curtume com biomassa de <i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542 em sistema de batelada.....	99

1. Introdução.....	100
2. Seção Experimental.....	101
3. Resultados e Discussão	104
4. Conclusões.....	108
5.Referências	109
ANEXOS.....	111
ANEXO A – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1	111
ANEXO B - ARTIGO 1 (VERSÃO LÍNGUA INGLESA).....	113
ANEXO C – NORMAS DA REVISTA MOLECULES (artigo 1).....	128
ANEXO D – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2	132
ANEXO E – NORMAS DO JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS (artigo 2)	133
ANEXO F – NORMAS DO OPEN ACCESS - INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH.....	146

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Minério de cromo	18
Figura 2 – Recuperação de cromo de banhos residuais	19
Figura 3 – Destino dos metais pesados libertados de forma descontrolada no ambiente e a sua acumulação ao longo da cadeia alimentar.....	20
Figura 4- Recepção de peles salgadas (A) e fulões (processamento de peles) (B).....	26
Figura 5 - Fluxograma esquemático da fabricação de couros - operações de ribeira, curtimento e acabamento molhado.....	27
Figura 6 - Fluxograma esquemático da fabricação de couros - operações de acabamento.....	27
Figura 7 - Estabelecimento de curtidores por região no Brasil	29
Figura 8 - Dermatite de contato alérgica (A) e ulceração na pele (B).....	32
Figura 9 – Mecanismos de biossorção. a) classificação de acordo com a dependência ao metabolismo celular; b) classificação de acordo com a localização, na célula, do metal removido.....	41
Figura 10 - Classificação taxonômica <i>C. elegans</i>	44

ARTIGO 1

Figura 1- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^3 , tendo como variáveis independentes: (1) asparagina (2) sacarose (3) milhocina e como variável resposta a concentração de biomassa	70
Figura 2 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) asparagina (2) sacarose (3) milhocina e como variável resposta o rendimento de quitosana.....	71
Figura 3. Espectros de absorção ao Infravermelho. (A) Quitosana microbiológica produzida por <i>Cunninghamella elegans</i> cultivada no meio sacarose, asparagina e milhocina (C:N; 2:6) e (B) Quitosana comercial.....	72
Figura 4. Difratoograma de Raios-X de quitosana. (A) Quitosana microbiológica de <i>C. elegans</i> na melhor condição do planejamento fatorial completo. (B) Difratoograma de Raios-X quitosana comercial	73

ARTIGO 2

- Figura 1. Chromium VI efficiency of biosorption by *Cunninghamella elegans* as time function and chromium concentration. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2. Capacities of adsorption initial metal ion concentration on removal of chromium VI by *Cunninghamella elegans*. Fungal dose 0.6 g, and 28⁰C, for 96h....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3. Kinetic pseudo-second order model for chromium biosorption by *Cunninghamella elegans*. Parameters used: solution volume: 150 mL; initial concentration: 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 mg/L; Biomass: 0,6 g; Temperature: 28 oC. 91
- Figura 4. Electronmicrographs of *Cunninghamella elegans* biomass. (A) Control sample, (B) biomass exposed to chromium 10mg/L, (C) biomass treated with 100mg/L of chromium. 93

ARTIGO 3

- Figura 1 - Capacidade de biossorção e eficiência de remoção do cromo pela biomassa *C. elegans* no efluente de curtume 105
- Figura 2 - Avaliação da fitotoxicidade com sementes de repolho e alface através do índice de germinação no efluente de curtume tratado com a biomassa de *C.elegans* em diferentes concentrações..... 107
- Figura 3 - Avaliação da fitotoxicidade germinação com sementes de repolho (*Brassica oleracea var. capitata*) no líquido resultante do trado com biomassa de *C.elegans*. (A) água (controle), (B) efluente de curtume bruto (não tratado) e (C) efluente de curtume tratado (com 2,4g.L⁻¹ de biomassa) após 96 horas..... 108

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Propriedades físicoquímicas do cromo	17
Tabela 2 - Produção de couro no Brasil por região em 2000	29
Tabela 3 - Principais aspectos e impactos ambientais do processo produtivo de curtumes	31
Tabela 4 - Contaminantes do curtume no processo convencional de produção e padrões de lançamento.....	34
Tabela 5 - Capacidade de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa.	39
Tabela 6 - Bioacumulação de metais pesados	40
Tabela 7 - Padrões de lançamentos de efluentes estabelecidos pelas legislações pertinentes.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 8 - Componentes nutricionais da milhocina.....	47

ARTIGO 1

Tabela 1 - Resultado da produção de biomassa e quitosana por <i>Cunninghamella elegans</i> no interval de 96h, 150 rpm, seguindo um planejamento fatorial de 2 ³	68
Tabela 2- Matriz do planejamento de 2 ³ para a produção de biomassa e quitosana por <i>Cunninghamella elegans</i>	74

ARTIGO 2

Tabela 1 – Parameters of kinetic pseudo-second order for Cr (VI) biosorption by <i>Cunninghamella elegans</i> biomass	91
---	----

ARTIGO 3

Tabela 1 - Avaliação físico-química do efluente de curtume tratado com biomassa de <i>C.elegans</i>	106
---	-----

LISTA DE ABREVIACOES

ABICALÇADOS	-	Associação Brasileira das Indústrias de Calçados
ABNT	-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABQTC	-	Associação Brasileira dos Químicos e Técnicos da Indústria do Couro
ABRAMEQ	-	Associação Brasileira das Indústrias de Máquinas e Equipamentos para os Setores do Couro, Calçados e Afins
AICSUL	-	Associação das Indústrias de Curtumes do Rio Grande do Sul
APHA	-	American Public Health Association
ARIP	-	Aterro de Resíduos Industriais Perigosos
BDA	-	Batata-Dextrose-gar
CETESB	-	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CICB	-	Centro das Indústrias de Curtumes do Brasil
CNPq	-	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONSEMA	-	Conselho Estadual de Meio Ambiente
CTC	-	Centro Tecnológico do Couro
DBO	-	Demanda Bioquímica de Oxignio
DQO	-	Demanda Química de Oxignio
DQO	-	Demanda Química de Oxignio
EAA	-	Espectroscopia de Absorção Atmica
EDL	-	Lâmpadas de Descarga sem Eletrodos
EUA	-	Estados Unidos
FACEPE	-	Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
FAO	-	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	-	Organização Internacional para Padronização e Sensibilidade
ISSO	-	International Organization for Standardization
IUE	-	International Union of Environment

IULTCS	-	International Union of Leather Technologists and Chemists Societies
MMA	-	Ministério do Meio Ambiente
NBR	-	Norma Brasileira
RS	-	Superfície de Resposta
SS	-	Sólidos Suspensos
SSMA	-	Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente
ST	-	Sólidos Totais
STF	-	Sólidos Totais Fixos
STV	-	Sólidos Totais Voláteis
UNICAP	-	Universidade Católica de Pernambuco
WFCC	-	World Federation Culture for Collection

RESUMO

A indústria do curtume é uma das principais atividades econômicas no Brasil com grande geração de divisas e empregos, contudo o processo de curtimento apresenta sérios riscos ambientais e a saúde humana devido à grande quantidade de efluentes gerados com alta carga de matéria orgânica e inorgânica. Sendo o cromo um dos principais composto no beneficiamento do couro e por este apresentar grande toxicidade aos seres vivos, faz-se necessário um processo de tratamento adequado do fluente. A utilização de biossorventes com capacidade para degradação, retenção, remoção ou recuperação de poluentes recalcitrantes tem sido empregado com sucesso em tratamento de efluentes industriais. Neste, estudo foi investigado o potencial biotecnológico do fungo *Cunninghamella elegans* (UCP 542/WFCC) para a produção de biomassa e quitosana, utilizando uma abundante suplementação de aminoácidos (asparagina e milhocina) associados à sacarose, empregando um planejamento fatorial completo de 2^3 para avaliar as interações e efeitos dos componentes. Os resultados obtidos indicaram que os ensaios no ponto central (Asparagina 0,025%, Sacarose 0,15%, suplementado com 0,45% de Milhocina), com relação Carbono:Nitrogênio de 2:6, observando-se rendimentos máximos de biomassa de $16,95\text{g.L}^{-1}$ e quitosana $2,14\text{g.L}^{-1}$. Os dados obtidos foram validados por meio de Diagramas de Pareto, grau de desacetilação da quitosana (75, 25%), através das bandas observadas por espectrofotometria ao raio infravermelho e difração de raio X. Estudos subsequentes foram realizados utilizando biomassa de *C. elegans* como sorbente na remoção de diferentes concentrações de Cr(VI) em solução aquosa. Os resultados obtidos demonstraram a remoção máxima de 97,2%, 90 %, 72,04%, 41,74 %, 36,39 % e 22, 16%, obtidos respectivamente para concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg / L de Cr (VI), pela biomassa *C. elegans* em 96h. A adsorção de cromo no micélio do fungo foi proporcional à concentração de cromo adsorvida. Os estudos cinéticos com a adsorção do cromo demonstraram um modelo pseudo de segunda ordem. Em seguida, investigações foram realizadas com o efluente da indústria de curtume caracterizando o efluente bruto, com posterior tratamento com a biomassa fúngica. O efluente bruto apresentou um total de $42,46\text{ mg.kg}^{-1}$ de cromo, além de elevados níveis de cálcio ($9.218,40\text{mg.L}^{-1}$), magnésio ($187,18\text{ mg.L}^{-1}$) e cloreto ($2162,43\text{ mg.L}^{-1}$). Após o tratamento com o maximo de biomassa ($2,4\text{g.L}^{-1}$) de *C. elegans* observou-se uma biossorção do cromo de 92%, demonstrando ainda, uma redução da dureza 99,5% para cálcio, 56,0% para magnésio e 76,9% para cloreto. O efluente após o tratamento com a biomassa demonstrou redução da fitotoxicidade para germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*). Os resultados obtidos sugerem que a biomassa de *C. elegans* é potencialmente aplicável para remoção do cromo provenientes de efluentes industriais, tendo em vista a utilização subprodutos como a milhocina para a produção de biomassa como um fator importante para o baixo custo do processo.

Palavras chave: *Cunninghamella elegans*, Biossorção, Cromo (VI), Efluente de curtume.

ABSTRACT

The tanning industry is a major economic activity in Brazil with large foreign exchange earnings and jobs, yet the tanning process presents serious environmental and human health risks due to the large amount of effluents with high load of organic and inorganic matter. Being one of the major chromium compound in leather processing and presenting this great toxicity to living beings, it is necessary a process of proper treatment of the effluent. The use of biosorbents capable of degradation, retention, removal or recovery of recalcitrant pollutants has been successfully employed in industrial wastewater treatment. In this, we investigate the biotechnological potential of the fungus *Cunninghamella elegans* (UCP 542/WFCC) for the production of biomass and chitosan, using an abundant amino acid supplementation (corn steep liquor and asparagine) associated with sucrose, employing a full factorial design 2^3 to assess the interactions and effects of the components. The results indicated that the tests at the midpoint (Asparagine 0.025%, 0.15% sucrose, supplemented with 0.45% of corn steep liquor), with respect Carbon: Nitrogen 2:6, observing maximum yield of biomass of 16 , chitosan 95g.L-1 and 2.14 gL-1. The data were validated by Pareto, degree of deacetylation of chitosan (75, 25%), through the bands observed by the infrared ray spectroscopy and X-ray diffraction Subsequent studies were conducted using biomass *C. elegans* as a sorbent in the removal of various concentrations of Cr (VI) in aqueous solution. The results showed maximum removal of 97.2%, 90%, 72.04%, 41.74%, 36.39% and 22 16%, respectively obtained for concentrations of 5, 10, 25, 50, 75 and 100 mg / l of Cr (VI) by biomass *C. elegans* in 96h. The adsorption of chromium in the mycelium of the fungus was proportional to the concentration of chromium adsorbed. The kinetic studies demonstrated the adsorption of chromium pseudo a model of second order. Then, investigations were carried out with the effluent from the tanning industry featuring the raw effluent with subsequent treatment with fungal biomass. The raw effluent had a total of 42.46 mg.kg-1 chrome, and high calcium levels (9218.40 mg L-1), magnesium (187.18 mg L-1) and chloride (2162.43 mg.L-1). After treatment with the maximum biomass (2.4 gL-1) *C. elegans* revealed a biosorption of chromium than 92%, still showing a reduction of 99.5% for calcium hardness, 56.0% to 76.9% for magnesium and chloride. The effluent after treatment with biomass showed a reduction in phytotoxicity to seed germination of lettuce (*Lactuca sativa*) and cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata*). The results suggest that *C. elegans* biomass is potentially applicable for removal of chromium from industrial effluents, ten \rightarrow in order to use by-products such as corn steep liquor for the production of biomass as an important factor for the low cost of the process.

Keywords: *Cunninghamella elegans*, Biosorption, Chromium (VI), Tannery wastewater.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial é um dos grandes responsáveis pela melhoria da qualidade de vida da população mundial, entretanto ele também pode gerar malefícios, não só à humanidade, mas à “saúde planetária”. Como resultado dos diversos processos industriais, muitos resíduos, contendo substâncias orgânicas e inorgânicas, são descartados ao meio ambiente, acarretando, desta forma, no desequilíbrio e degradação de diversos ecossistemas (KOLPIN *et al.*, 2002; LUCAS *et al.*, 2007; BORBA, 2010).

As águas residuárias de indústrias (têxteis, alimentícias, farmacêuticas, petroquímicas, siderúrgicas, termoeletricas, cosméticas, de curtume, papéis, plásticos, madeiras, tintas, fertilizantes, automóveis, vidros e de cimentos) contêm grandes concentrações de rejeitos, os quais são, em sua maioria, resíduos de difícil degradação; quando lançados aos recursos naturais, sem qualquer tipo de tratamento, tornam-se bastante preocupantes por seu “poder poluente” (NJIKI *et al.*, 2009; PALÁCIO *et al.*, 2009; GRUPTA *et al.*, 2010). O processo de tratamento de couro, por exemplo, caracteriza-se por empregar grandes quantidades de água, devido às diversas etapas de tratamento da pele, realizadas em fase aquosa ou em regime de batelada, sendo, por isso, um grande gerador de água residuária. A indústria de couro emprega cerca de 30-40L água/Kg de pele processada, podendo chegar ao consumo de 50L água/Kg de pele processada, quando o uso da água é ineficiente. Conseqüentemente, um curtume de porte médio, que processe 3.000 peles salgadas/dia, consome aproximadamente 1.900 m³ de água/dia, equivalente ao consumo diário de uma população de 10.500 habitantes, tendo o consumo médio per capita de 180 L/dia. Dessa maneira, o curtume pode comprometer o equilíbrio de mananciais e dos recursos hídricos em geral (GANEN, 2007).

Dados estatísticos mundiais apontaram que no ano de 2008, o rebanho de bovinos alcançou a marca de 1,57 bilhões de cabeças de gado, registrando-se também que o comércio mundial de couros e artigos bovinos evoluiu da década de setenta a 2007 em US\$ 58,2 bilhões (FAO, 2008).

A indústria do couro no Brasil tem grande importância para a economia do país, sendo um setor que apresenta grande geração de divisas e de empregos, além do couro estar entre os principais produtos de exportação brasileira. O Brasil ocupa lugar de destaque no setor coureiro, sendo considerado um dos maiores exportadores mundiais de couro bovino do

mundo com rebanho de 200 milhões de cabeças.

Segundo os dados do Centro das Indústrias de Curtumes do Brasil (CICB) em 2008, o setor coureiro-calçadista brasileiro movimentou um PIB estimado em US\$ 3,5 bilhões, representando 8% da balança comercial brasileira; este setor dispõe de 800 empresas de produção e processamento de couro, havendo 50 mil postos de trabalho (SILVEIRA, 2009).

A utilização de metais pesados é comum no tratamento de produtos nas indústrias de curtume, sendo o cromo o mais utilizado (NJIKI *et al.*, 2009). Neste aspecto, compreende-se que o lançamento de águas residuárias industriais com metais pesados podem afetar diretamente os ambientes aquáticos de corpos receptores, tornando-se uma ameaça para os seres vivos (DURUIBE *et al.*, 2007). Por conta de danos ambientais, vários estudos são dirigidos à busca de alternativas que permitam o reuso e reciclo da água através do tratamento de efluentes (HU *et al.*, 2008; PIETROBELLI *et al.*, 2009).

Os resíduos líquidos gerados nos processos de curtimento do couro apresentam uma alta carga de matéria orgânica e inorgânica, isto ocorre em função da considerável quantidade de proteínas e gorduras eliminadas da pele do animal e do excesso de produtos químicos e metais pesados utilizados. Portanto, os efluentes gerados pelo setor coureiro apresentam resultados preocupantes a respeito de sólidos totais (ST), sólidos totais fixos (STF), sólidos totais voláteis (STV), sólidos em suspensão, demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sulfetos, pH (alcalino), além da concentração de íons cromo (PIETROBELLI *et al.*, 2009)

Um beneficiamento de couro, que atenda as exigências do mercado, necessita de um processamento físico-químico muito intenso, envolvendo grande quantidade de substâncias químicas, em especial substâncias a base de cromo, tais como: dicromato de potássio e o dicromato de sódio, vistas como as mais perigosas, tóxicas; e gerando, conseqüentemente, muitos resíduos, potencialmente agressivos ao meio ambiente. Sendo assim, o lançamento de efluentes industriais de curtume sem tratamento adequado representa uma ameaça à biota aquática e à saúde humana, além de promover a degradação do meio e alteração de sua qualidade (VALE *et al.*, 2011).

O cromo pode ser usado, em grande quantidade, para a transformação de peles de animais em um produto resistente a degradação. Todavia, um fato preocupante é que 40% do cromo utilizado nesta técnica é desprezado no ambiente, sendo necessária utilização de técnicas para remoção do metal pesado do ambiente. O composto usado nesse processo na

forma de sulfato de cromo III ($\text{Cr}_2(\text{SO}_4)$), promove o enrijecimento da pele, garantindo a preservação final do produto. Contudo duas formas de cromo são utilizadas nos curtumes, o Cr (III) e o Cr(VI). O Cr (III) apresenta-se nos rejeitos na forma solúvel e até mesmo em baixas concentrações, sendo tóxico aos peixes e plantas aquáticas, além de inibir a fotossíntese. O Cr (VI) encontra-se em menor quantidade nos efluentes de curtume, podendo ser absorvido e acumulado nas brânquias dos peixes, causando grande risco a esse seres aquáticos e saúde humana (DURAN; ESPÓSITO, 2000; ACEVEDO, 2010).

O tratamento de ambientes contaminados por metais pesados geralmente envolve processos físico-químicos de precipitação, floculação, eletrólise, cristalização ou adsorção, porém esses métodos são onerosos, além de também poder contribuir para a formação de novos contaminantes. Portanto, torna-se indispensável o desenvolvimento de tecnologias mais precisas e de fácil realização na remoção de metais dos efluentes (PIETROBELLI *et al.*, 2009). Uma das tecnologias alternativas que vem sendo utilizada é o processo de biossorção através de tratamento microbiológico, com base nas propriedades dos componentes de superfície celular dos micro-organismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias) e vários materiais biológicos como resíduos da produção agroindustrial, com capacidade para retenção, remoção ou recuperação de poluentes recalcitrantes. (CARNEIRO e GARIGLIO 2010) Além de possível a utilização do potencial enzimático dos micro-organismos no processo de biotransformação, o qual envolve o processo de degradação, promovendo a clivagem molecular dos compostos xenobióticos (ROCHA *et al.*, 2005).

Os fungos da classe Zygomycetes, constituem um grupo especial de fungos de grande interesse biotecnológico, considerando a sua capacidade de sobreviver em diversos habitats, além da presença de quitina e quitosana em suas paredes celulares (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Biopolímeros como a quitina e quitosana extraídos da biomassa de *Cunninghamella elegans* podem ser a grande alternativa para problemática dos efluentes, podendo ser utilizados no processo de biossorção de metais pesados, a exemplo do ferro, chumbo, cobre e cromo, de acordo com a concentração e pH da solução metálica (FRANCO *et al.*, 2004). Os mecanismos pelos quais os micro-organismos podem remover o cromo incluem: (a) a acumulação extracelular/precipitação; (b) absorção pela superfície celular complexação ou biossorção e (c) acumulação intracelular. Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o uso de adsorventes biológicos e não biológicos, na tentativa de minimizar o conteúdo do cromo em efluentes para alcançar a meta da diminuição do cromo

em efluentes das indústrias de curtumes. (BISHNOI, N. R. *et al* 2007; MORALES, *et al*, 2010; DALCIN, M. G., *et al* 2011; BAJGAI, *et al*, 2012).

A biossorção de cromo (VI) ou sua redução para cromo (III), constatado como menos tóxico, por micro-organismos são processos úteis na remediação de sólidos e águas contaminadas. Entretanto, para o pleno desenvolvimento dessas oportunidades, é fundamental que culturas puras e autênticas estejam disponíveis para o desenvolvimento desses projetos biotecnológicos (DALCIN, 2011).

Considerando atualmente uma crescente exigência de qualidade nos processos de beneficiamento do couro bem como uma tendência dos consumidores optando por produtos mais ambientalmente responsáveis, foi essencial para que as empresas comecem a se adaptar a este novo paradigma de mudanças no processo de produção. Uma vez que os métodos tradicionais vem acarretando uma série de danos impactante sobre o ambiente e a saúde (ALVES, *et al*. 2008).

Assim, de uma forma mais ampla, a busca pelo desenvolvimento de processos de produção de couro mais limpa, bem como, a melhoria da qualidade da matéria-prima tornam-se cada vez mais importantes, exigindo avanços tecnológicos nos processos de tratamento do couro, de modo a substituir o uso de substâncias xenobióticas, especialmente o cromo; como também para o cumprimento de normas ambientais por meio do desenvolvimento de métodos de tratamento e recuperação dos efluentes gerados pela indústrias do couro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial biotecnológico da *Cunninghamella elegans* (UCP/WFCC 0542) na produção de biomassa e quitosana e aplicação na remoção do cromo em soluções aquosas e efluente de curtume.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a associação de diferentes substratos na produção da biomassa e de quitosana por *C. elegans* empregando um planejamento fatorial de 2^3 ;
- Extrair e caracterizar quitosana a partir da biomassa de *C. elegans*;
- Aplicar estudos cinéticos na remoção do Cr(VI) pela biomassa de *C. elegans* em diferentes concentrações em solução aquosa;
- Realizar estudos ultraestruturais sobre o mecanismo de sorção do cromo pela biomassa de *C. elegans*;
- Avaliar e caracterizar bioquimicamente o efluente da indústria de curtume;
- Investigar o processo de biossorção do cromo contido no efluente de curtume pela biomassa de *C. elegans*;
- Avaliar a eficiência do processo de biossorção do cromo;
- Investigar a fitotoxicidade do efluente de curtume tratado com a biomassa de *C. elegans*;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 METAIS PESADOS E O MEIO AMBIENTE

3.1.1 Metais pesados

Nas últimas décadas, a crescente utilização de recursos minerais pelas indústrias e o conseqüente extrativismo, tornou-se sério problema a ser resolvido devido ao o impacto potencial dos metais pesados ao meio ambiente, saúde pública e economia. Quimicamente, os metais pesados são definidos como elemento de massa específica superior a 5 g/cm^3 . Dentre todos os metais pesados aqueles que estão associados a problemas de poluição são o antimônio, arsênio, cádmio, cromo, cobalto, cobre, ferro, chumbo, mercúrio, níquel, prata, tálio, estanho, vanádio e zinco (SZE *et al.*, 1996; MALIK, 2004).

Os efluentes resultantes de atividades fabris ligadas à industria têxtil, eletrônica, metalúrgica entre outros contêm quantidades consideráveis de metais pesados. Os problemas relacionados ao meio ambiente e à saúde pública ocasionados pela ação desses metais estão geralmente ligados a emissão de descargas incontroladas de águas residuais podem gerar danos irreparáveis aos ecossistemas e bioacumulação ao longo da cadeia alimentar com conseqüente efeitos tóxicos nos seres vivos . Sendo assim, as descargas feitas para cursos aquáticos superficiais sem o tratamento adequado pode repercutir na acumulação e conseqüente degradação desses corpos d'águas (MALIK, 2004; AHLUWALIA; GOYAL, 2007).

3.1.2 Cromo

Particularmente, o elemento cromo pertence ao grupo dos metais de transição, descoberto em 1797 pelo químico francês, Louis Vauquelin. A palavra cromo é originada do grego “Chroma” que significa cor, devido à variabilidade da coloração dos compostos contendo este elemento. O cromo é o sétimo mais abundante na terra e o vigésimo primeiro na crosta terrestre onde varia entre 100 e $300 \mu\text{g.g}^{-1}$. A tabela 1 apresenta as propriedades físicas do referido elemento. Ele possui uma configuração eletrônica $3d^4.4s^2$, entretanto seu número de oxidação mais alto correspondente ao total de elétrons dos subníveis 3d e 4s. Seus estados

de oxidação variam entre -2 e +6, sendo os estados de oxidação +3 e +6 os mais estáveis no ambiente. (Siva 2001)

O cromo se encontra de forma abundante na crosta terrestre, em depósitos naturais, combinado a outros elementos, principalmente com o oxigênio. Os principais compostos de cromo são os óxidos de cromo III (Cr_2O_3) de coloração verde e insolúvel em água, óxido de cromo VI (CrO_4^{2-}) de coloração vermelha com solubilidade em água igual a $62,42 \text{ g L}^{-1}$ e o dicromato de potássio $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de coloração alaranjada com solubilidade em água igual a $11,7 \text{ g L}^{-1}$. A cromita ou dicromato de ferro é o mineral de cromo mais importante economicamente, encontrado majoritariamente na África do Sul com 96% das reservas mundiais, Rússia e Filipinas; com 33,1% de FeO e 67,9% de Cr_2O_3 , porém o FeO pode ser parcialmente substituído por MgO e o Cr_2O_3 por Al_2O_3 . O dicromato é utilizado na obtenção de cromo metálico, na liga de ferro-cromo utilizada no aço e em diversas classes de ferros fundidos. Outras fontes menos comuns de cromo são: cromato de chumbo, PbCrO_4 e o óxido de crômio Cr_2O_3 (QUINTELAS, 2007; SILVA, 2011).

Tabela 1 - Propriedades físicoquímicas do cromo

Símbolo Químico	Cr
Cor	Metálico prateado
Características	Duro, resiste à corrosão
Ponto de fusão	1907°C
Ponto de ebulição	2671°C
Número Atômico	24
Massa Molar	51.996 g
Densidade	7.14 g cm^{-3}
Volume atômico	$7.23 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$
Raio Atômico	1.30 Å
Raio Covalente	1.18 Å
Electronegatividade	1.66

Fonte: Silva 2001

O cromo é um metal branco-prateado, brilhante, com um elevado grau de dureza, resistente aos agentes corrosivos normais e raramente encontrado no estado livre na natureza (figura 1). O cromo trivalente Cr (III) é essencial do ponto de vista nutricional, não é tóxico, pouco absorvido no organismo. Já o cromo hexavalente Cr (VI) é altamente tóxico, afetando seriamente os rins e o sistema respiratório; embora não esteja claramente definido o nível de não-efeito do Cr(VI), alguns estudos sugerem que a ingestão máxima de 0,5 mg/L evitaria riscos à saúde. Considera-se que o cromo na sua forma hexavalente é 100 e 1000 vezes mais tóxico do que no estado de oxidação trivalente.

O cromo é um elemento essencial para a vida animal e sua deficiência pode causar alguns problemas aos seres humanos. Certas doenças têm sido associadas a essa deficiência como: certas formas de diabete, arteriosclerose, problemas do crescimento, catarata ocular e menor tolerância à glicose (KELLER; CHERNICHARO, 2005).



Figura 1 - Minério de cromo
Fonte: VIEIRA (2009)

Estima-se que a produção mundial do cromo é de 107 t.ano^{-1} , desta 60 a 70% destina-se a produção de metalóides como o aço inoxidável, 15% é utilizado em processos químicos industriais, em particular em indústrias têxteis e de curtumes, produção de pigmentos e tintas, e no revestimento de superfícies por deposição electrolítica. O cromo também é muito utilizado como proteção contra a corrosão, produção de catalisadores, bactericidas e fungicidas, conservantes de madeira e no alumínio anodizado na indústria de aviação. Estas variadas aplicações “tornaram” o cromo num sério contaminante do ar, do solo e da água (FERRAZ *et al.*, 2007).

3.1.3 Reciclagem do Cromo

A recuperação do cromo de banhos residuais de curtumes é feita com a precipitação do cromo residual sob a forma de hidróxido de cromo (III), com posterior sedimentação do precipitado formado. Em seguida, o precipitado é dissolvido com ácido sulfúrico, sob adição controlada, de forma a obter-se novamente o sulfato de cromo (ou sulfato de cromo monobásico).

O licor recém-preparado é reutilizado como agente curtente ou recurtente, dosando, se necessário, um curtente adicional, bem como o sal utilizado (NaCl). Para a precipitação do cromo podem ser usados os seguintes agentes alcalinos: hidróxidos de cálcio

($\text{Ca}(\text{OH})_2$), de sódio (NaOH) e de amônio (NH_4OH), bem como óxido de magnésio (MgO) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3). A figura 2 ilustra as fases de recuperação de cromo de banhos residuais (CETESB, 2005).

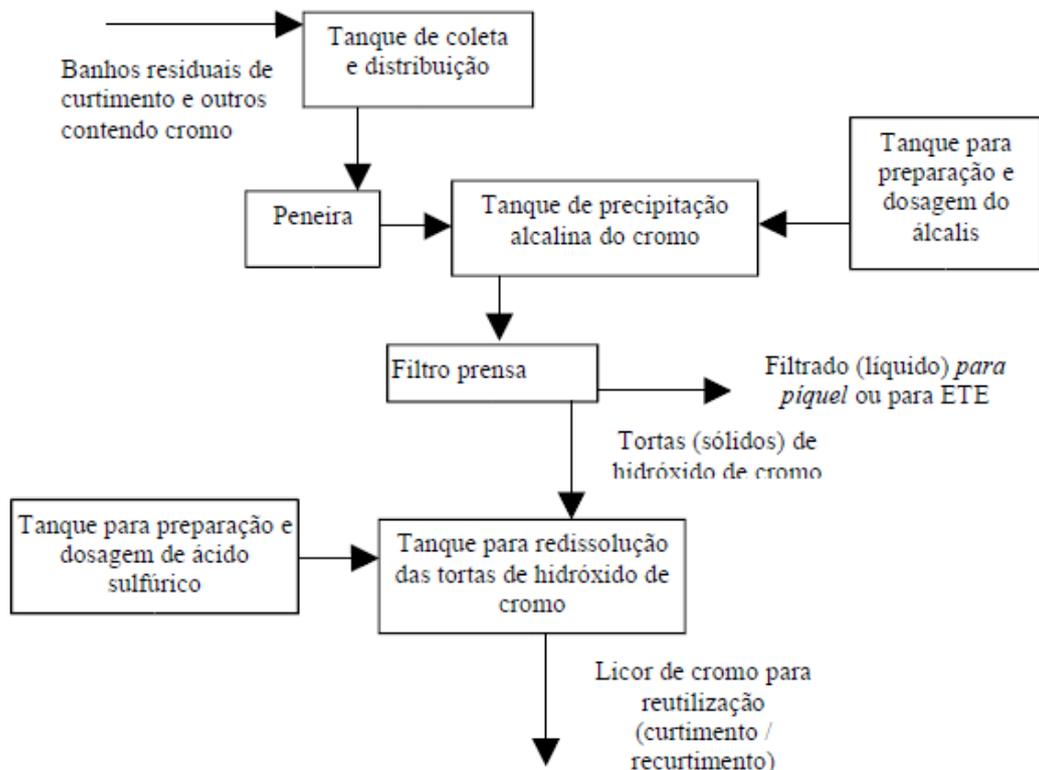


Figura 2 – Recuperação de cromo de banhos residuais

Fonte: CETESB (2005)

3.1.4 Cromo no Ambiente

Os metais oriundos de atividades como as explorações mineiras, industrialização e urbanização contribuem significativamente para acelerar os fluxos de metais na ecossfera. Entre as razões pelas quais pode-se considerar os metais pesados como os principais poluentes inorgânicos estão: sua elevada mobilidade nos ecossistemas aquáticos, sua alta toxicidade para as formas de vida superiores, além de seu forte poder de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar (LOPEZ *et al.*, 2002; BISHNOI *et al.*, 2007). Os efeitos gerados pela bioacumulação começam a surgir à medida que tais metais são repassados por meio da alimentação de um nível trófico para outro superior, acumulando-se nos tecidos dos seres vivos ao longo da cadeia alimentar, atingindo por fim o Homem. Desta forma, os efeitos

tóxicos atingem mais os animais dos níveis tróficos superiores, (figura 3).



Figura 3 – Destino dos metais pesados libertados de forma descontrolada no ambiente e a sua acumulação ao longo da cadeia alimentar.

Fonte: Adaptado de VOLESKY (2001).

Um grande número de micro-organismos, através da atividade celular, pode contribuir para alterar a especiação e a mobilidade dos metais em diferentes ciclos biogeoquímicos, levando-os a sofrer transformações antes de se consolidarem nos biomas (SRINATH *et al.*, 2002). A capacidade que os micro-organismos possuem de afetar a especiação dos metais está baseada em sua função de conduzir ou mediar os processos de mobilização ou imobilização, os quais influenciam no balanço de espécies metálicas entre as fases solúveis e insolúveis. A mobilização de metais pode ocorrer por protonação, quelação e transformação química, enquanto que a imobilização pode ocorrer por precipitação, cristalização de compostos orgânicos ou inorgânicos insolúveis, sorção, acumulação e até por sequestro intracelular; além disso, sabe-se também que as reações redox podem mobilizar ou imobilizar metais, dependendo das espécies metálicas envolvidas (GADD, 2004).

O reconhecimento a cerca dos efeitos tóxicos e dos impactos negativos provocados pelos metais pesados no ambiente têm contribuído significativamente para a introdução de regulamentações mais restritivas, visto que se aumentou, com o passar do tempo, a fiscalização referente à concentração de metais pesados em descarga de águas residuais e também em águas para consumo humano (VOLESKY, 2001). A imposição de uma regulamentação mais rígida aumenta a necessidade de inovar as tecnologias de tratamento existentes para a remoção desses metais, a fim de atingir os limites de concentração de toxicidade nos efluentes (ZOUBOULIS *et al.*, 2004). A Indústria tem, desse modo, o dever de cumprir com os requisitos legais, mantendo, de modo eficaz, seus baixos

custos de capital e de operação (REMOUDAKI *et al.*, 2003).

3.1.5 Toxicidade do Cromo

Na atualidade, a contaminação por contato ou ingestão de metais pesados é muito comum e passa de forma “despercebida” por boa parte da população. Em grandes quantidades, estes metais se acumulam no organismo causando sintomas diversos. O mal causado pelos metais pesados aos seres vivos está associado aos danos que eles podem provocar ao sistema nervoso, fígado e ossos, além de serem capazes de bloquear grupos funcionais de enzimas vitais (MALIK, 2004; SHUGABA, 2011).

A toxicidade dos metais tem sido constatada em diferentes fatos ao longo da História, como o caso da população Japonesa que vivia na baía de Minimata, que comia peixe e marisco contaminado por metil-mercúrio, manifestando assim doenças neurológicas; outro fato ocorreu nas margens do rio Jinstsu, onde a população alimentavam-se de arroz, quando este era irrigado por águas contaminadas com cádmio, chumbo e níquel (ROSTAMI; JOODAKI, 2002).

Os metais do ponto de vista fisiológico podem ser classificados em três categorias: essenciais não-tóxicos (Ca e Mg), essenciais mas nocivos acima de determinada concentração (Fe, Mn, Zn, Cu, Co e Mo) e tóxicos quando prejudicam o crescimento ou o metabolismo de um organismo (Hg, Pb e Cd). De acordo com ponto de vista ecotoxicológico, os metais mais perigosos são mercúrio, chumbo, cádmio e cromo em sua forma hexavalente, chamados de não essenciais, sem qualquer função biológica (AHLUWALIA; GOYAL, 2007). Dentre os metais pesados, o cromo é conhecido por apresentar características bastante nocivas à saúde. Ele é causador de várias complicações metabólicas como: irritação das vias respiratórias superiores, dermatites, perturbações gastrointestinais (vômitos), diarreia, queimaduras epigástricas, além de induzir mal formações do sistema nervoso central em fetos humanos em formação (SZE *et al.*, 1996).

3.1.6 Sorbente x Remoção de Cromo

O processo de adsorção é conhecido desde o século XVII, quando se observou que certa espécie de carvão retinha, em seus poros, grande quantidade de vapor d'água, o qual era liberado quando submetido ao aquecimento. A adsorção é um termo utilizado para

descrever o fenômeno no qual moléculas que estão em um fluido, líquido ou gasoso, concentram-se espontaneamente sobre a superfície sólida. A formação de uma camada adsorvida numa superfície não é um processo instantâneo, porém é geralmente governada pela velocidade de difusão da substância tensoativa através da solução, em direção à interface. Os principais elementos da adsorção são o fluido (adsortivo), a superfície na qual o fenômeno ocorre (adsorvente) e os componentes retidos pelas superfícies (adsorbato). O termo sorção, juntamente com os termos sorbente, sorbato e sortivo são também utilizados para denotar ambos, adsorção e absorção, quando ocorrem simultaneamente ou não podem ser distinguidos (DABROWSKI, 2001; COELHO, 2006; ALIDOKHT *et al.*, 2011).

Alguns micro-organismos possuem a capacidade de acumular metais pesados, em um processo chamado de biossorção. Na maioria dos estudos sobre biossorção de íons metálicos, estes são removidos na forma de cátions, uma vez que a maioria dos metais, quando em solução, encontra-se na sua forma catiônica; outros podem sim ser encontrados na forma de ânions, o cromo é um exemplo deles, sendo o ânion CrO_4^{2-} (Cr(VI)) altamente tóxico.

A remoção de Cr (VI) tem sido avaliada por vários pesquisadores com diferentes tipos de adsorventes, biológicos e não biológicos (PANDAY *et al.*, 1984; SAG; KUTSAL, 1989; SHARMA; FORSTER, 1993). Em todos os casos o pH da solução teve uma influência muito grande na capacidade de remoção do cromo(VI), sendo que as maiores remoções de cromo foram obtidas em pH 2,0. A temperatura exerce uma menor influência, mas o aumento da temperatura (numa faixa de 25 a 45 °C) provoca uma redução na capacidade de retenção em vários adsorventes (NOURBAKHSI *et al.*, 1994). Estudos foram realizados a respeito da capacidade de adsorção de um consórcio de bactérias desnitrificantes para CrO_4^{2-} , a fim de determinar quais fatores afetavam a quantidade de metal captada pela biomassa. Os fatores observados foram: pH, temperatura, concentração de tetracloreto de carbono, estado da biomassa (viva ou morta) e concentração de Fe^{3+} . Foi constatada, então, a biossorção competitiva entre os íons de Cr(VI)/ferro(III) e Cr(VI)/cobre(II) pela biomassa do fungo *Rhizopus arrhizus*. Para o sistema cromo/ferro, tanto o cromo como o ferro foram mais efetivamente adsorvidos em pH 2,0. A capacidade de sorção de cromo e de ferro foi reduzida pela presença de concentrações crescentes de cada um dos metais (GUAN *et al.*, 1993).

Uma grande variedade de micro-organismos pode se ligar a metais. Entretanto, há grandes diferenças nas respostas das espécies microbianas quando expostas a soluções metálicas. As paredes de bactérias, algas e fungos são eficientes biossorventes de metais, e em

muitos casos a ligação inicial pode ser seguida pela deposição inorgânica de quantidades crescentes de metal. Ligações covalentes e iônicas podem estar envolvidas na biossorção, com constituintes tais como proteínas e polissacarídeos (GADD, 1990).

Uma quantidade significativa de fungos pode conter as substâncias quitina/quitosana como parte integrante da estrutura de sua parede celular. A ligação de íons metálicos tóxicos pela quitosana ou pela quitina é uma consequência direta da base forte dos grupos de amina primárias existentes (SAG; KUTSAL 1996a; 1996b). A exemplo do Cr (VI) que pode ser acumulado em elevadas concentrações, chegando até 34 mg/g em alguns micro-organismos.

O mecanismo de resistência e redução do Cr(VI) pode diferir em uma comunidade microbiana, sendo o seu desempenho relativo de grupo para grupo (FRANCISCO *et al.*, 2002; SRINATH, 2002). Em alguns organismos, a redução do Cr (VI) ocorre intracelularmente, já que a enzima está ligada à membrana, nesse caso, o substrato é absorvido a partir do meio para as células. A taxa de acumulação de Cr (VI) e a sua subsequente conversão em Cr (III) diferem de organismo para organismo e a absorção do substrato reduzido é um dos mecanismos de resistência para o cromo em muitos micro-organismos (CZAKO-VER *et al.*, 1999; MIDDLETON *et al.*, 2003).

Na remoção do cromo hexavalente por biomassa fúngica, com meios de cultura contendo micélio ativo de *A. Niger* e *A. Parasiticus*, foi observado um melhor desempenho na remoção de Cr (VI) de 19,1% e de 15,7% para *A. Niger* e *A. Parasiticus* respectivamente. Estas observações sugerem que a remoção Cr (VI) pelos fungos estudados ocorre principalmente por conta de um processo metabólico que envolve absorção e redução ou bioacumulação metabólica, sem redução. Além disso, a redução significativa da concentração Cr (VI), na presença de micélios inativados, sugere uma absorção passiva (biossorção) (SHUGABA, 2012).

A bioacumulação de metais pesados é um processo pelo qual células microbianas sequestram íons metálicos intracelularmente por um processo metabólico ativo, mediado apenas pela biomassa viva. Na biossorção, a biomassa microbiana é ligada a quantidades significativas de íons de metais por meio de um processo passivo, mediado por biomassa viva ou morta (KAPOOR; VIVRARAGHAVAN, 1998; GUPTA *et al.*, 2000; DESJARDIN *et al.*, 2002).

O processo de exploração biotecnológica da biossorção e bioacumulação de metais pesados por micro-organismos depende da eficiência da regeneração da biomassa

microbiana e sua consequente reutilização em múltiplos ciclos. Na biorremediação de íons de metal, o rendimento da biomassa microbiana viva está diretamente ligado ao estado em que se encontra o sorbente, visto que os efeitos tóxicos provocados pelos metais pesados podem resultar na morte celular (YAN; VIRARAGHAVAN, 2000). O Cromo hexavalente é altamente tóxico para muitos micro-organismos, podendo causar danos estruturais nas células, afetando, desse modo, o crescimento (SANI *et al.*, 2001; MIDDLETON *et al.*, 2003; SHUGABA, 2012).

3.2 INDÚSTRIA DE CURTUME: ASPECTOS GERAIS

3.2.1 Histórico do Beneficiamento do Couro

A utilização da pele de animais é uma prática antiga, realizada inicialmente pelo Homem pré-histórico. A princípio, não havia sido desenvolvido um processo completamente eficaz na conservação dessa pele, do couro, entretanto métodos rudimentares, a exemplo da secagem ao sol eram feitos. A “arte de curtir” o couro, embora antiga, tem sofrido uma evolução significativa em seu processo de desenvolvimento e apresenta, na atualidade, grande importância no ramo das confecções.

No século VIII, a vinda dos árabes à Europa resultou na introdução da “arte de curtir” peles de animais, empregando conjuntamente os extratos vegetais, como o tanino, muito utilizado como curtente. A instalação do primeiro curtume no continente europeu só foi realizada no século XVIII, todavia o setor conseguiu sua consolidação no século seguinte. Até então, o trabalho feito com o couro era realizado por meio do trabalho manual e as técnicas e “segredos” do curtimento eram repassados para as gerações futuras (BELLO, 1993; SOUZA, 2010).

Os primeiros processos de curtimento estavam baseados apenas na observação e na experiência popular, entretanto a partir de 1974 a ciência iniciou sua pesquisa aprofundada e trouxe ao ramo diferentes benefícios. Nesse período, foram introduzidas as máquinas nos curtumes, abolindo, assim, a maior parte das operações manuais e proporcionando o aperfeiçoamento dos métodos utilizados. Dessa maneira, as técnicas de curtimento foram evoluindo, porém não se havia conquistado as grandes proporções fabris, visto que os investimentos em pesquisa ainda eram mínimos. No Brasil, a indústria de couros teve seu

início com o processo imigratório promovido por Dom Pedro II. A chegada de artesãos italianos principalmente para a Região de Franca - SP e dos artesãos alemães para a Região do Vale, nas proximidades de Porto Alegre, foram cruciais para a consolidação do setor no território brasileiro (BRENNER, 1990; RUPPENTHAL, 2001).

3.2.2 Indústria de Curtimento do Couro: aspectos gerais

O couro natural corresponde a toda pele de animal tratada através de um processo químico chamado de curtimento, por meio dele fibras são alteradas com auxílio de produtos naturais ou sintéticos, os quais são definidos como curtentes. O couro verdadeiro apresenta as seguintes propriedades: permite à pele respirar, sendo, portanto, permeável à transpiração, é elástico e flexível, muito resistente à tração e à abrasão (ROSA, 2003).

O curtimento é um processo a parte que torna o couro inerte e imputrescível. Na maioria dos curtumes brasileiros o curtimento mineral com cromo é o mais utilizado, pelo tempo relativamente curto de processo e pela qualidade que confere aos couros em suas principais aplicações. A fonte de cromo normalmente utilizada é o sulfato básico de cromo, onde este se encontra no estado trivalente, essa matéria-prima liga-se as proteínas acidificadas da pele impedindo sua biodegradação e gerando o couro, que é a pele já curtida. (PACHECO, 2005, NUNES, 2012).

Todavia, essa técnica foi sendo aperfeiçoada e o material contido nas cascas das árvores, o tanino, passou a ser industrializado, sendo o primeiro material curtente utilizado em larga escala. Os couros foram sendo curtidos, por um bom tempo, apenas com tanino, o qual é um material orgânico natural, de fácil manejo e que não provoca poluição ambiental. Porém, as características conferidas ao couro curtido com tanino não estavam atendendo às exigências do mercado (ROSA, 2003).

O beneficiamento de couro é uma atividade de destaque em muitos países como EUA, Rússia, Índia e Argentina e são dependentes da agro-economia, estima-se que cerca de 1,7 trilhões de m² de couro são produzidos anualmente no mundo, com o valor de aproximadamente US\$ 70 bilhões (RAO *et al.*, 2003).

Por conta das crescentes necessidades e exigências do agronegócio, a busca por um couro mais flexível, macio, com maior resistência à temperatura e com menor tempo de processo estimulou a indústria a desenvolver novos processos de curtimento. A partir de então, iniciou-se o desenvolvimento do curtimento a cromo, utilizando-se um material

curtente a base de produtos químicos como dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e o dicromato de sódio ($Na_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$); neste curtente, o cromo hexavalente era reduzido a cromo trivalente no próprio curtume, já que somente nesta valência o cromo tem seu poder de curtimento. Essa técnica oferecia grande risco ambiental, uma vez que ocasionalmente poderia sobrar na reação algum resíduo de cromo hexavalente. Hoje, existem no mercado produtos comerciais à base de trióxido de cromo (Cr_2O_3), ou seja, somente cromo trivalente, o que garante maior confiabilidade ao processo a ser realizado (KANTH *et al.*, 2009) As figuras 4A e 4B ilustram a recepção da matéria-prima e operação de carga de peles bovinas para processamento.



Figura 4- Recepção de peles salgadas (A) e fulões (processamento de peles) (B)
Fonte: CETESB (2005)

3.2.3 Processamento do Couro

O processamento do couro pode variar de curtume para curtume, dependendo do tipo de produto final a ser obtido, porém a produção em batelada é ainda o sistema empregado na maioria dos curtumes. Este sistema consiste na utilização de fulões (grandes recipientes cilíndricos, normalmente de madeira), cujas dimensões variam de 1 a 5 metros de altura e largura, com capacidades variando de alguns quilogramas até 20 toneladas ou mais, e com rotação de 2 a 12 rpm, de acordo com o processo Jost, (1996). Em geral, o processamento do couro está dividido nas seguintes etapas: Conservação das peles; Pré-remolho; Pré-descarne; Remolho; Depilação e Caleiro; Descarne; Recorte; Divisão; Purga; Píquel; Curtimento; Enxugamento; Rebaixamento; Neutralização; Recurtimento; Tingimento e Engraxe. Curtimento é o processo de transformação das peles em material estável e imputrescível ser utilizados curtentes orgânicos, como os taninos vegetais, aldeídos e parafinas sulfocloradas, ou curtentes inorgânicos, com os sais de cromo, zircônio, alumínio e ferro (CLAAS; MAIA, 1994).

As Figuras 5 e 6 mostram, em duas partes, um fluxograma genérico do processamento completo para fabricação de couros, desde as peles frescas ou salgadas até os couros totalmente acabados, destacando-se os principais pontos de geração de resíduos.

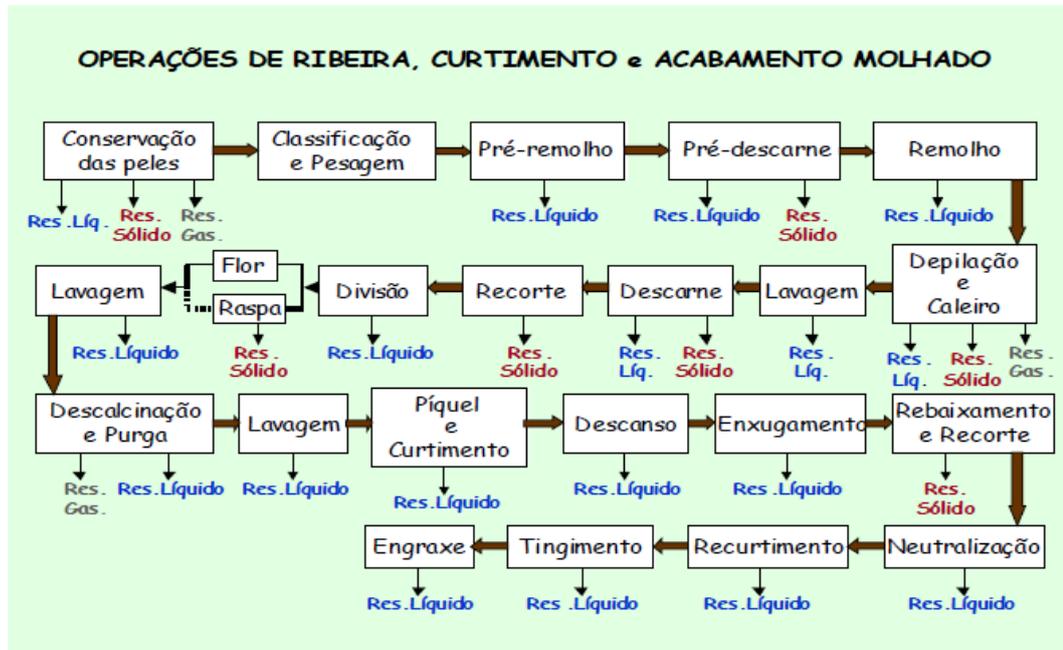


Figura 5 - Fluxograma esquemático da fabricação de couros - operações de ribeira, curtimento e acabamento molhado.

Fonte: CETESB (2005)

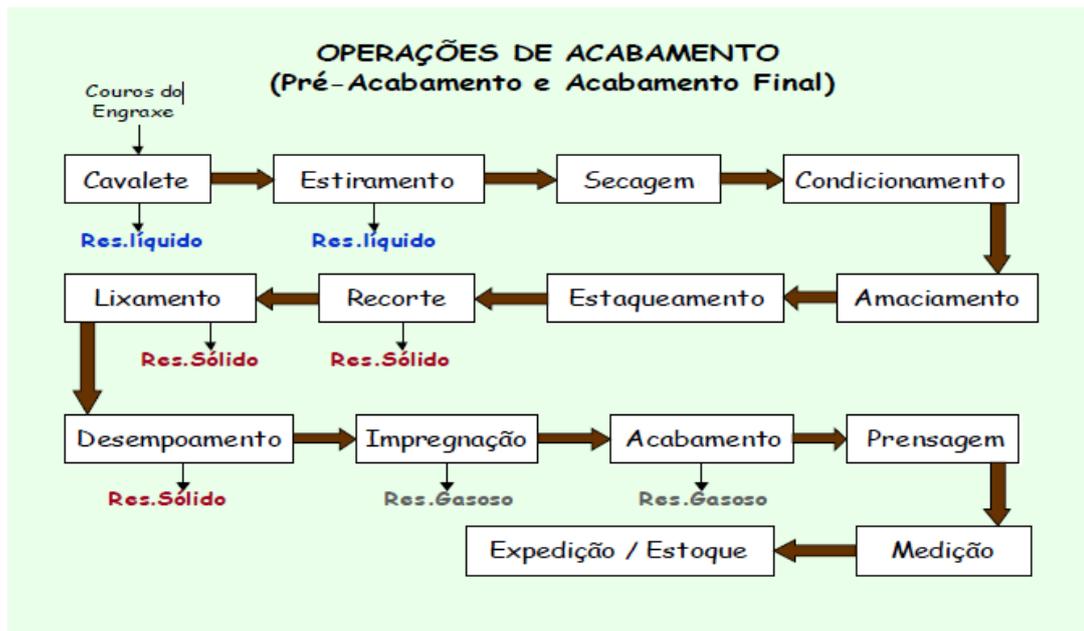


Figura 6 - Fluxograma esquemático da fabricação de couros - operações de acabamento
Fonte: CETESB (2005)

3.2.4 Couro: produto nobre e de importância econômica

O couro natural corresponde a toda pele de animal tratada através de um processo químico chamado de curtimento, por meio dele fibras que são alteradas com auxílio de produtos naturais ou sintéticos, os quais são definidos como curtentes. O couro verdadeiro apresenta as seguintes propriedades: permite à pele respirar, sendo, portanto, permeável à transpiração, é elástico e flexível, muito resistente à tração e à abrasão (ROSA, 2003).

A indústria coureira no Brasil tem grande importância para a economia do país, sendo um setor que apresenta grande geração de divisas e de empregos, além do couro figurar entre os principais produtos de exportação brasileira (CUNHA *et al.*, 2009).

Conforme dados do BNDES o desempenho da pecuária brasileira vem também possibilitando o desenvolvimento da indústria processadora de couro. O Brasil conta hoje com o maior rebanho bovino do mundo com mais de 200 milhões de cabeça, o que por sua vez oferece uma abundante matéria prima e possibilita preços competitivos no mercado internacional.

Dados sobre as exportações de 2012 divulgados pelo Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) mostra que a indústria de couro no Brasil exportou cerca de US\$ 2,071 bilhões neste ano tornando-se o 2º maior exportador mundial ficando atrás somente da China. O setor tem-se mostrado como uma atividade de relevância devido a sua importância econômica e social.

A indústria de couro está atrelada especialmente aos curtumes (locais de tratamento do couro) que por sua vez formem o produto para diferentes indústrias, que utilizam o couro como um de seus insumos: calçados e artefatos, vestuário, móveis e automobilística, etc.

A indústria brasileira de calçados só no ano de 2000 produziu, com base em estimativas do IBGE (2003) perto de 530 milhões de pares de calçados; maior fração dessa produção, cerca de 70%, é destinada ao mercado interno (o setor é praticamente auto-suficiente no atendimento ao consumo interno), enquanto 30% são dirigidas ao exterior. Graças à demanda por couro para móveis italianos, bancos de carros japoneses e europeus, bolsas e outros artefatos indianos e africanos e até coturnos ingleses que as exportações do produto brasileiro dobraram nos últimos dez anos (SANTOS *et al.*, 2002).

A indústria brasileira de couro possui cerca de 450 curtumes, sendo que cerca de 80% são considerados de pequeno porte. Além dos curtumes como unidades autônomas de

negócio, têm-se observado uma verticalização dos frigoríficos, atuando também como curtidores. A produção e a indústria de couros localizam-se principalmente no sul e no sudeste do país, como mostram a Tabela 2 e a Figura 07, havendo atualmente tendência de deslocamento para um novo pólo no Centro-Oeste, em função de realocização de rebanhos e frigoríficos, bem como da existência de incentivos e de outras condições favoráveis nesta região (CICB – 2005).

Tabela 2 - Produção de couro no Brasil por região em 2000

REGIÃO	NÚMERO D COURO	PARTICIPAÇÃO (%)
Sul	12.385.750	38
Suldeste	11.027.250	33
Centro-Oeste	4.920500	15
Nordeste	3.562000	11
Norte	604.500	2
Total	32.500.000	100

Fonte: adaptado da CETESB (2005)

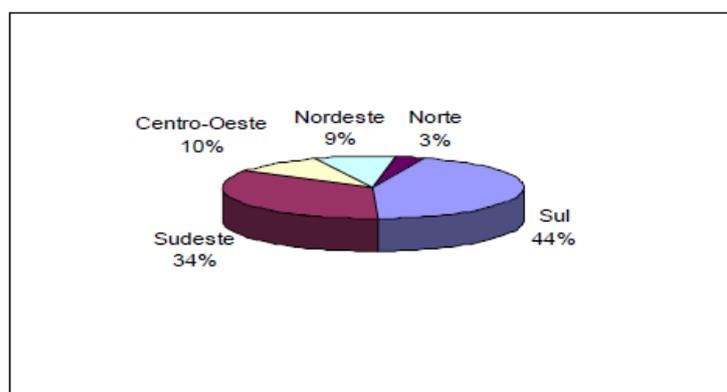


Figura 7 - Estabelecimento de curtidores por região no Brasil
Fonte: CETESB (2005)

A crescente exigência mundial de qualidade nos processos de beneficiamento do couro, além dos consumidores optarem por produtos mais ambientalmente corretos, tornam-se essenciais para as empresas começarem a promover mudanças no processo de produção, uma vez que os métodos tradicionais acarretam uma série de danos impactantes sobre o meio ambiente e a saúde humana (ALVES, *et al.* 2008).

3.2.5 Processos de Curtimento e Acabamento

O processo de curtimento do couro gera uma quantidade significativa de resíduos que em contato com o meio ambiente podem causar sérios danos ambientais. Os sais de cromo trivalente a princípio não são tóxicos, porém em condições propícias, podem ser oxidados a cromo hexavalente, o qual é nocivo ao organismo humano, e em excesso pode desencadear diferentes enfermidades como alergias, ulcerações, perfurações no septo nasal, além da grave possibilidade carcinogênica. Outro agravante é o lançamento de matéria orgânica degradável no meio aquático, o que implica em alterações na qualidade da água, provocando a diminuição da quantidade de oxigênio dissolvido. Além do mais, se pode ocasionar aumento da turbidez da água, o qual resulta na diminuição da penetração de luz nos reservatórios de águas superficiais, provocando alteração na fotossíntese das algas e afetando desta maneira a produção interna de oxigênio. No efluente de curtume é constatada também a presença de enxofre, o qual em condições anaeróbias está na forma de sulfeto, que pode gerar o gás sulfídrico (H_2S) ou ácido sulfúrico (H_2SO_4), os quais são tóxicos e corrosivos, além de provocar a elevação do pH do meio. No entanto, esforços crescentes para sua substituição são verificados, devido ao seu impacto ambiental potencialmente negativo (PACHECO, 2005; SILVEIRA, 2009).

3.2.6 Impactos Ambientais na Produção de Couro

Dentre os principais causadores dos impactos ambientais da indústria de couro estão: os produtos químicos utilizados, entre eles, solventes e agentes branqueadores e o cromo necessário ao processo de curtimento, o qual apresenta sérios riscos ao meio ambiente. Sendo assim, o efluente gerado nesta atividade deve sofrer o tratamento cabível e apresentar coerência com os padrões de qualidade postos pela legislação. A tabela 3 mostra os principais aspectos e impactos ambientais do processo produtivo de curtume.

Tabela 3 - Principais aspectos e impactos ambientais do processo produtivo de curtumes

Etapa Básica do Processo	Poluição	Aspectos Ambiental emissão	Impacto Ambiental Potencial	Enquadramento Legal Principal Estado de São Paulo
Conservação e armazenamento das peles	1. Ar 2. Hídrica 3. Solo	1. NH ₃ COVs (1) 2. Eventuais líquidos eliminados 3. Apêndices de peles e sal com matéria orgânica	1. Odor – Incômodo ao bem estar público 2. Prejuízo à qualidade dos corpos d'águas 3. Eventual contaminação do solo e de água subterrâneas	Poluição do ar: - Art. 2º e 3º, Inciso V do Decreto 8486/76 com redação dada pelo Decreto 15425/80. - Art. 33º do decreto 8486/76 com redação dada pelo Decreto 1542/80.
Ribeira	1. Ar 2. Hídrica 3. Solo	1. H ₂ S (10), NH ₃ e COVs 2. Banho residual de tratamento das peles e águas de lavagens intermediárias – carga orgânica e produtos químicos (sulfeto, sais diversos e outros). 3. Carnaça, pelos, aparas, recortes e raspa de peles, sem e com produtos químicos	1. Odor – incômodo ao bem estar público 2. Prejuízos à qualidade dos corpos d'águas 3. Eventual contaminação do solo e de águas subterrâneas	Poluição hídrica: - Art. 18º ou 19-A do Decreto 8486/76 com redação dada pelo Decreto 15425/80. - art. 34º da resolução CONAMA 357/05, alterada pela resolução CONAMA 397/08.
Curtimenta	1. Hídrica	1. Banho residual de curtimento das peles – carga orgânica e produtos químicos (cromo, tanino, sais diversos)	1 Prejuízo à qualidade dos corpos d'águas.	Atendimento aos padrões de qualidade do corpo receptor, de acordo com sua classe, constante nas legislações estadual e federal.
Acabamento	1. Ar 2. Hídrica 3. Solo	1. COVs – dos solventes 2. Banho residuais (tratamento do couro) - cargas orgânica e produtos químicos (cromo, taninos, corantes 3. Pó / ser-ragem de rebaixadeira, recortes de couros curtidos, semi-acabados, resíduos de produtos de acabamento	1. Odor – incômodo ao bem estar público 2. Prejuízo à qualidade dos corpos d'água; 3.Eventual contaminação do solo e de águas subterrâneas	Observação: para lançamento de efluentes em corpos de água de classe 2 e 3 há necessidade de atendimento à Resolução SMA nº 3 de 22/02/2000. Poluição do solo / Resíduo sólidos industriais: - Art. 51º a 55º do Decerto 8486/76 com redação dada pelo Decreto 15425/80.

Fonte: Adaptado da (CETESB, 2005)

A grande utilização de metais pesados em processos industriais, nas últimas décadas, teve como consequência um aumento significativo no fluxo de substâncias metálicas no ambiente (MORALES, 2010).

Os despejos de cromo nos ecossistemas aquáticos tornaram-se motivo de preocupação em todas as áreas de curtume. O cromo é um poluente introduzido nos sistemas aquáticos por unidades de processamento de couro e pode causar diversos riscos à saúde humana. Relatos na literatura indicam que cerca de 10% de Cr ingerido por seres humanos é absorvido no trato gastrointestinal e tem como consequência a carcinogenicidade, além disso o cromo pode causar dermatite de contato alérgica e ulceração na pele respectivamente na figura 8 A e B (SINGH *et al.*, 2009). Sabe-se também que alguns íons metálicos são venenos cumulativos, podendo ser assimilados e armazenados, podendo causar de efeitos fisiológicos perceptíveis (ADEKUNLE *et al.*, 2010; SCHLLEMER, 2012).



Figura 8 - Dermatite de contato alérgica (A) e ulceração na pele (B)

Fonte: www.waikato.gov.nz, Distric health board (2010)

O tratamento empregado hoje consiste basicamente na separação dos materiais por tipo, retirada do material sólido de maior tamanho e logo em seguida, uma sequência de processos químicos e biológicos empregados com a finalidade de aumentar o reuso da água no processo produtivo; adequando o lançamento dos resíduos finais, tanto sólidos quanto líquidos aos parâmetros estabelecidos pela legislação ambiental. Estes procedimentos são utilizados por uma grande quantidade de curtumes e, se bem empregados e monitorados, são efetivos na adequação dos efluentes à legislação vigente. É importante citar que ainda existe o relevante problema da disposição final dos resíduos das estações de tratamento, a qual, com o enrijecimento das normas ambientais, tornou-se um grande entrave à gestão ambiental dos curtumes (CLAAS; MAIA, 1994).

A tecnologia de produção é muito importante na determinação da característica do efluente. Os produtos químicos utilizados no processo de produção determinam o tratamento necessário, bem como as unidades de tratamento empregadas. Esses produtos, os quais geralmente possuem em sua composição alguns sais, podem comprometer a qualidade dos efluentes de curtume; entre eles estão: sulfato, cromo, fungicidas, diferentes tipos de corante e materiais de acabamento (SCHRANK *et al.*, 2004).

Os efluentes gerados nas indústrias de curtume são classificados de acordo com a natureza e seus efeitos nas águas receptoras. Os efluentes gerados pelo curtimento do couro têm em suas principais características um alto teor de DQO, DBO, ST, STV, STF e sulfetos. Neles também são constatados a presença de sangue, produtos em decomposição, pêlos, graxa, fibras e uma grande concentração de metais pesados, principalmente o cromo (BORBA, 2010).

Segundo Jost (1996), o efluente de curtume possui outras importantes características:

- Taninos do tipo vegetal e sintético;
- Tensoativos aniônicos, não-aniônicos e catiônicos;
- Solventes;
- Aminas e aminoálcoois;
- Corantes ácidos, básicos e complexados com metais;
- Fungicidas e/ou bactericidas;
- Componentes minerais;
- Desencalantes: cloreto e sulfato de amônio;
- Basificantes: formiato de sódio e de cálcio, bicarbonato e carbonato de sódio, óxidos de cálcio e magnésio;
- Alvejantes: clorito, hipoclorito, bissulfito e metabissulfito de sódio, peróxido de hidrogênio;
- Curtentes e recurtentes: íons de cromo, alumínio e zircônio.

Estão na tabela 4, os dados médios referentes às cargas orgânica e inorgânica geradas no beneficiamento de pele e couros, conforme dados coletados pela IUE (*International Union of Environment*) da IULTCS (*International Union of Leather Technologists and Chemists Societies*) e com a participação de vários países, entre eles, o Brasil (AJMAL, 2011).

Tabela 4 - Contaminantes do curtume no processo convencional de produção e padrões de lançamento.

Parâmetro	Ribeira (Kg/t)	Curtimento (Kg/t)	Recurtimento (Kg/t)	Total (Kg/t)	Efluente final (mg/L)	CONAMA 430/2011	CONSEMA 128
DQO	135	5	20	160	5330	-	150 - 400
CLORETO	135	30	2	167	5570	250	-
SULFETO	8	-	-	8	270	0,002	0,2
N-TOTAL	12	0,5	1	13,5	450	-	10, 15 ou 20
N-NH4	3,5	0,2	0,8	4,5	150	10	20

Fonte: Adaptado de Ganem (2007)

3.2.8 Tratamentos de Efluente da Indústria de Couro

3.2.8.1 Tratamento Físico-Químico

O processo de remoção de íons metálicos de efluentes é bastante importante e do ponto de vista ambiental, é imprescindível que a reutilização da água seja eficaz. Na atualidade, os tratamentos físico-químicos mais aplicados na remoção de metais de águas residuais são: i) a precipitação com hidróxidos, carbonatos ou sulfuretos; ii) a oxidação-redução química, iii) sorção (adsorção/troca iônica); iv) processos membranares (ultrafiltração, electrodiálise, osmose reversa); v) recuperação electrolítica; vi) evaporação; vii) extração líquido-líquido; viii) eletrodeposição. Todos eles com suas vantagens e limitações (GOYAL *et al.*, 2003; KALYANI *et al.*, 2004).

Dentre os métodos citados, a precipitação é o mais comum; os metais são precipitados na forma de hidróxidos pela adição de hidróxido de cálcio ou de sódio, um método simples e de baixo custo. Esse processo também apresenta desvantagens, como a grande quantidade de lama resultante, além da dificuldade de encontrar seu destino final e os riscos de contaminação, podendo ainda conter na água tratada, metais em concentrações da ordem dos mg.L^{-1} . Outros métodos como a evaporação, eletrólise, osmose inversa e troca iônica têm limitações na sua aplicabilidade por razões econômicas e/ou tecnológicas, incluindo elevados custos de operação, obstrução de componentes, impraticabilidade a baixas concentrações de metal, recuperação não seletiva etc (SZE *et al.*, 1996).

O Tratamento Físico-Químico do efluente do efluente de curtume constitui a base de

todo processo depurador de efluentes gerados nas etapas de curtimento do couro, nele são utilizados dispositivos que permitem a remoção de substâncias que são fisicamente separáveis dos líquidos. No uso destes processos, os poluentes não são degradados ou eliminados, apenas transferidos para uma nova fase (geralmente ao lodo). Com o uso dessa técnica os agravantes ambientais não são resolvidos, visto que os poluentes encontram-se bastante concentrados (CETESB, 2005).

Em geral, o tratamento físico-químico de efluentes de curtumes caracteriza-se pelos seguintes processos unitários:

- **Gradeamento:** Separação de materiais grosseiros como pedaços de couro, carcaças, entre outros corpos sólidos, os quais podem acarretar alguns problemas, a exemplo do desgaste das bombas e obstruções de tubulações em etapas posteriores;
- **Remoção de óleos e graxas:** Separação líquido-líquido para os óleos (ex. decantação) e sólido-líquido para as graxas (ex. filtração);
- **Peneiramento:** Por meio de dispositivos mecânicos, como uma chapa metálica perfurada, a qual atua como filtro, o efluente é peneirado;
- **Homogeneização:** Os efluentes gerados nas etapas do processo industrial são misturados, esta mistura é realizada através de um mecanismo de agitação.
- **Correção do pH e coagulação:** O valor ideal do pH é aquele no qual a coagulação se dá em tempo relativamente curto, com formação de flocos grandes e de um clarificado límpido. O pH ótimo depende do coagulante utilizado e do tipo do efluente a ser tratado; os coagulantes mais utilizados são sulfato de alumínio e cloreto férrico;
- **Floculação:** Processo no qual partículas coloidais neutralizadas são agregadas, tornando-se maiores em tamanho e massa. Através da adição de moléculas de cadeia longa, como polímeros, cujas subunidades são ionizáveis (polieletrólitos), forma-se um aglomerado de partículas por adsorção e formação de pontes.

Entretanto, a aplicação destes tratamentos por questões de condições de processo, de operação ou dos materiais utilizados pode se tornar pouco atraente, tanto pelo custo operacional e também por gerar uma grande quantidade de lodo metálico, cuja composição depende das linhas coletoras de efluentes instaladas na empresa. (VANBROEKHOVEN et al., 2005; SHRIVASTAVA, 2009)

Muitas vezes o processo não permite atingir níveis de metais pesados suficientemente reduzidos às concentrações de lançamento estabelecidas pela legislação vigente, sendo necessária à aplicação de um processo complementar para o polimento final do efluente (VOLESKY, 2004)

Para o tratamento complementar em efluentes com substâncias recalcitrantes em baixas concentrações podem se utilizados processos com membranas e os processos de sorção. A adsorção é uma das técnicas mais efetivas no tratamento de águas e águas residuárias. Processos de adsorção são largamente utilizados para remoção de cor, odores ou gosto no tratamento e purificação de águas, óleos, produtos farmacêuticos e efluentes de processo. O sucesso de um adsorvente industrial no campo das operações unitárias depende em grande parte da facilidade com que o adsorvato pode ser retirado, seja para fins de aproveitamento, como para regenerar o adsorvente (VIEIRA; VOLESKY, 2000; VOLESKY, 2001; DAVIS *et al.*, 2003; RIBEIRA, 2011)

A adsorção consiste em um processo de separação relativamente simples, envolve o contato de uma fase fluida livre (líquida ou gasosa) com uma fase rígida permanente (adsorvente), granulada, que tem a propriedade de reter e de guardar seletivamente uma, ou mais de uma, entre as espécies contidas inicialmente no fluido. Uma vez que o adsorvato concentra-se na superfície do adsorvente, quanto maior for esta superfície, maior será a eficiência da adsorção. Por isso geralmente os adsorventes são sólidos com partículas porosas (SAG *et al.*, 2000; ALLI, 2012).

Este processo é normalmente muito eficiente, sendo possível explorar as propriedades do processo para recuperar metais seletivamente; o adsorvente ideal para remover metais pesados de águas residuais industriais deve preencher os seguintes requisitos, comuns aos adsorventes convencionais: i) possuir elevada capacidade de remoção de metais e elevada velocidade de acumulação; ii) ter o tamanho, forma e as propriedades físicas que permitam uma eficiente separação do efluente tratado, além de ter a capacidade de ser utilizado em sistemas de fluxo contínuo; iii) ser produzido a baixo custo e ser reutilizável sem perda significativa de viabilidade, permitindo também a recuperação dos metais sorvidos de forma econômica (PALMIERI *et al.*, 2002; YUN; VOLESKY, 2003; EMBRAPA, 2013).

3.2.8.2 Processos de biorremocão de metal pesado

O termo biorremediação é normalmente associado à despoluição ambiental pela aplicação de sistemas biológicos, os quais transformam os poluentes em produtos menos perigosos para o ambiente (REIS *et al.*, 2003). Essa denominação pode parecer não completamente ajustada quando aplicada a metais, pois na realidade nenhum processo pode degradar ou eliminar elementos inorgânicos (BARKAY; SCHAEFER, 2001). Os micro-organismos são capazes apenas alterar as suas propriedades químicas através de mecanismos complexos de biossorção (GAVRILESCU, 2004; ARAVINDHAN, 2012).

Os tratamentos biológicos são aplicados quando se deseja remover determinados grupos de substâncias, como corantes e complexos orgânicos. Esses processos são fundamentados na utilização de micro-organismos, os quais se proliferam na presença de resíduos, utilizando-os como fonte de carbono e nitrogênio; e por envolver fenômenos biológicos, dependem também dos fatores físico-químicos do meio. A temperatura, o pH e a concentração de oxigênio dissolvido influenciam diretamente no desenvolvimento dos micro-organismos envolvidos no sistema. Entre os tratamentos aplicáveis em curtumes, pode-se citar: lagoas de estabilização, lagoas anaeróbias, lagoas aeradas, lodos ativados, leitos percoladores, biodigestores anaeróbios e sistemas biológicos mistos. Os efluentes de curtume possuem grande quantidade de matéria orgânica e o processo biológico anaeróbio torna-se favorecido por resultar numa baixa produção de lodo; todavia, ele não supri as necessidades de remoção dos metais pesados (CLAAS; MAIA, 1994; SUER, 2006).

A capacidade que alguns micro-organismos possuem de concentrar em si grandes quantidades de metais pesados de efluentes líquidos é bastante conhecida. Por isso, esta propriedade tem sido explorada com o intuito de se desenvolver sistemas para o tratamento de efluentes com metais pesados. A maioria dos microrganismos (protozoários, fungos, algas, bactérias) é capaz de adsorver o cromo (SILVA; PEDROZO, 2001). A possibilidade de diminuição da biodegradação dos lodos de curtume no solo e dos efluentes líquidos está intimamente relacionada com a atividade microbiana, a qual pode ser inibida pelas altas concentrações de sais, elevados valores de pH e toxicidade do cromo (MARTINES, 2005; BAJGAI *et al.*, 2012).

A biossorção é conceituada como um processo passivo de ligação de íons à biomassa viva ou morta a qual é também reconhecida por ser uma potencial alternativa às

tecnologias existentes (VOLESKY, 2001; PALMIERI *et al.*, 2002).

Uma das motivações à implementação da bioissorção em escala industrial é a sua elevada eficiência no tratamento de águas residuais com baixas concentrações de metais pesados, além, é claro, da qualidade do efluente gerado e dos baixos custos que lhe estão associados. O primeiro desafio que se colocou a frente do desenvolvimento da bioissorção foi à seleção dos tipos de biomassa mais promissores dentre a vasta oferta de produtos com elevada disponibilidade e baixo custo (AHLUWALIA; GOYAL, 2007). Ao invés de procurar entre as espécies microbianas, aquelas que têm características particulares para o sequestro de metais, torna-se mais vantajoso procurar biomassas já disponíveis em grandes quantidades a fim de suprir a potencial procura. Esta busca tem centrado a atenção nas capacidades de ligação entre metais e micro-organismos (fungos, bactérias, leveduras, algas etc) (AKTHAR, 1996; GOYAL *et al.*, 2003).

O tipo e a fonte de biomassa têm um papel determinante no custo total do material bioissorvente, se a biomassa precisar ser cultivada especificamente para este propósito, o preço de venda incluirá os custos de manutenção, de produção e ainda as taxas comerciais. Os biomateriais a serem utilizados podem ter como origem: i) subprodutos de indústrias de fermentação; ii) organismos naturalmente disponíveis em grandes quantidades na natureza e iii) biomassa com elevada capacidade de bioissorção, especificamente propagada de forma relativamente econômica em biorreatores, utilizando-se meios de crescimento com fontes de carbono de baixo custo (*e.g.* melão e soro de queijo) (SAG, 2001; AHLUWALIA ; GOYAL, 2007).

Compreende-se, então, que o custo de produção de biomassa especificamente para estas aplicações pode tornar o processo economicamente inviável à escala industrial. A matéria-prima que constitui os bioissorventes deve ser, preferencialmente, um material residual ou subproduto, como acontece com a biomassa obtida em processos de fermentação para escala industrial (ZOUBOULIS *et al.*, 2001; GARG *et al.*, 2007; AJMAL, 2010).

Na tabela 5 estão os diferentes tipos de biomassa capazes de remover vários tipos de metais no mundo microbiano. Os resultados destes estudos variam amplamente por causa dos diferentes critérios utilizados pelos autores na pesquisa dos materiais convenientes.

Tabela 5 - Capacidade de remoção de metais pesados por diferentes tipos de biomassa.

Sorbentes / fúngicos	Metal	Remoção do metal mg/g	Referências
<i>Rhizopus arrhizu</i>	Ag	54	Tobin et alli., (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ag	4,7	Brady e Ducan, (1993)
<i>Aspergillus niger</i>	Au	176	Kuyucak e Volesky, (1988)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Au	164	Kuyucak e Volesky, (1988)
<i>Candida tropicalis</i>	Cu	80	Mattuschka et alli., (1993)
<i>Absidia orchidis</i>	Pb	351	Holan e Volesky, (1995)
<i>S. cerevisiae</i>	Cd	15,41	Chen e Wang (2007)
<i>Mucor rouxii</i>	Cd	20,31	Yan e Viraraghavan, 2003
<i>Mucor rouxii</i>	Ni	20,49	Yan e Viraraghavan, 2003
<i>S. cerevisiae</i>	Cr	12,84	Chen e Wang (2007)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Cr	31	Tobin et al., (1984)
<i>Rhizopus nigricanspus</i>	Cr	123,45	Bai e Abraham, (2002)
<i>S. cerevisiae</i>	Cr	93,34	Bingol et al.,(2004)
<i>Aspergillus Níger</i>	Cr	19,1	Shugaba et al., (2012)
<i>Aspergillus parasitieu</i>	Cr	15,7	Shugaba et al., (2012)
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Cr	7,91	Sharma, Adholeya (2011)

O termo biossorção é definido como um processo no qual os sólidos de origem natural ou seus derivados são usados na remoção/recuperação de metais pesados em meio aquoso. A biossorção compreende na ligação de metais à biomassa por um processo que não envolve energia metabólica ou transporte, embora tais processos possam ocorrer simultaneamente quando a biomassa viva for usada, visto que a biossorção pode ocorrer com biomassa morta ou viva (COSSICH; TAVARES, 2000). Embora células vivas e mortas sejam capazes de acumular metais, pode haver diferenças nos mecanismos envolvidos em cada caso, sujeitando-se à extensão da dependência metabólica (GADD, 1990; SAG, 2001; DETTMER, 2008).

A biossorção de metais não é baseada num único mecanismo, ela consiste em vários que quantitativa e qualitativamente se diferem de acordo com as espécies usadas. Na biossorção de metais segue mecanismos complexos, entre eles: troca iônica, quelação, adsorção por forças físicas e o aprisionamento de íons em capilares inter e intrafibrilares e em espaços da rede de polissacarídeos estruturais, como resultado do gradiente de concentração e difusão através da parede celular e membranas (COSSICH; TAVARES, 2000; NAMASIVAYAM, 2008).

No processo de bioacumulação caracteriza-se pela acumulação ativa de metais por células vivas, este processo é dependente da atividade metabólica da célula. A tolerância aos metais deve refletir na habilidade de um organismo sobreviver em ambientes com altas

concentrações de metais, sem resultar na sua morte. O uso de biomassa microbiana com a finalidade de tratar efluentes industriais por meio da bioissorção, disponibiliza uma tecnologia alternativa potencial (LLOYD, 2003). No mecanismo de bioacumulação, muitos micro-organismos ligam-se efetivamente a íons metálicos bastante tóxicos. Nesse processo, são reconhecidos dois mecanismos: o primeiro envolve a ligação que ocorre na superfície da membrana celular sem gasto de energia e no segundo, os íons metálicos podem entrar na célula através da membrana e participar das vias bioquímicas (VELÁSQUEZ; DUSSAN, 2009; UYSAL, 2010). Na tabela 6, Pinto *et al.* (2004) citam alguns exemplos de micro-organismos estudados no acúmulo de metais como Prata, Cádmio, Ouro, Manganês, Zinco e outros.

Tabela 6 - Bioacumulação de metais pesados

Tipo	Microrganismo	Metal
Bactérias	<i>Streptomyces sp.</i>	Prata
	<i>Bacillus subtilis</i>	Cádmio/Manganês/Ouro
	<i>Zooglea SP.</i>	Cobalto/Cobre/Urânio
	<i>Citrobacter sp.</i>	Chumbo/Cádmio/Urânio
	<i>Bacillus SP</i>	Cádmio/Cobre/Chumbo
	<i>Micrococcus luteus</i>	Cádmio
Algas	<i>Chlorella vulgaris</i>	Cádmio/Zinco
	<i>Chlorella homosphaera</i>	Cádmio/Zinco
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Cádmio/Zinco
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	Cádmio/Cobre/Ouro/Lantânio
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Cádmio/Cobre/Zinco
	<i>Penicillium sp</i>	Alumínio/Chumbo/Estanho
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Chumbo/Tório/Urânio
	<i>Rhizopus arrizus</i>	Cromo/Manganês/Mercúrio
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cádmio/Cobre/Urânio

Fonte: Adaptado de PINTO *et al.* (2004)

Os micro-organismos podem ser utilizados para eliminar a contaminação ambiental por metais, removendo-os de águas contaminadas, sequestrando do solos e de sedimentos ou até mesmo solubilizando-os, facilitando a sua extração (MEJARE; BULOW, 2001).

A imobilização de metais pode ser designada pelo termo genérico “bioissorção”, que se refere ao sequestro de íons metálicos por materiais sólidos de origem natural (YAN; VIRARAGHAVAN, 2003; VOLESKY, 2003). Também definem bioissorção num sentido amplo, como os métodos biológicos utilizados para a remoção de metais. No entanto, outros autores optam por considerar a bioissorção apenas como a forma passiva de remoção de metais, independente da atividade metabólica e que ocorre mesmo com biomassa morta,

distinguindo-a da forma ativa de acumulação de metais, dependente da atividade metabólica da célula, designada de bioacumulação (TSEZOS *et al.*, 1995; TSEZOS *et al.*, 1997; SHUGABA,2010).

A classificação dos mecanismos de acumulação de metais pode ser feita no tipo de dependência do metabolismo celular ou de acordo com a localização do metal na célula. Presente na Figura 9.

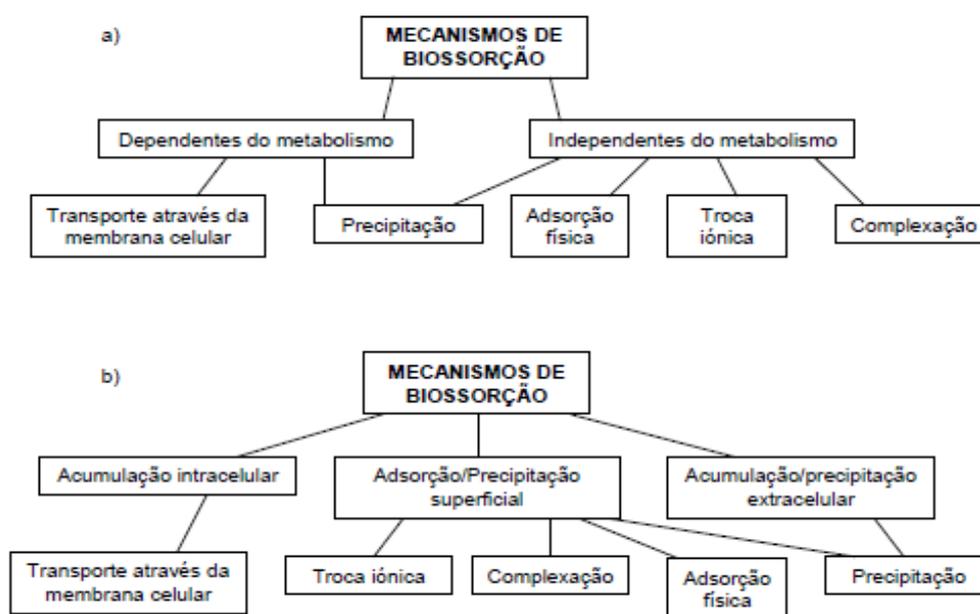


Figura 9 – Mecanismos de bioissorção. a) classificação de acordo com a dependência ao metabolismo celular; b) classificação de acordo com a localização, na célula, do metal removido.

Fonte: Adaptado de VEGLIO e BEOLCHINI (1997).

3.2.9 Indústria de Curtume e a Legislação Ambiental

O Conselho Nacional do Meio Ambiente estabelece que a concentração máxima de Cr(VI) nos efluentes a serem descartados seja inferior a 0,5 p.p.m e para Cr(III) seja inferior a 2,0 p.p.m. Portanto, é essencial que os curtumes utilizem técnicas de redução dos níveis de cromo em seus efluentes para um descarte adequado dos resíduos no meio ambiente (CONAMA nº 20 /1986).

A conhecida Lei do Couro nº 11.211, de 19 de dezembro de 2005, que se esperava atender a regulamentação do setor, apenas define couro como um “produto oriundo

exclusivamente de pele animal curtida por qualquer processo”; as questões específicas, referentes aos aspectos ambientais não são tratadas. No art. 7º, I, diz-se que apenas obriga os fabricantes ou importadores de calçados e artefatos a identificação por meio de símbolos dos seus materiais empregados na fabricação dos produtos.

Com a consolidação de uma legislação que regulamenta o controle ambiental, a indústria passou a tratar os efluentes gerados nos processos produtivos do couro antes de serem lançados nos corpos de água. Sendo assim, conclui-se que a regulamentação fica aos encargos das resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA e dos órgãos Estaduais, responsáveis por estabelecer normas específicas, de modo que os efluentes não comprometam o padrão de qualidade em que o corpo de água está enquadrado (BIBLIOTECA CÂMARA, 2007). A tabela 7 registra dados como parâmetros de pH, temperatura, DBO, DQO, ST, alumínio, cromo total e ferro dissolvido, comparando-os com alguns dos diferentes padrões de lançamentos de efluentes estabelecidos pelo CONAMA 357/05, SSMA 01/89 - RS, CONSEMA 128/06 e pelo decreto N° 8.468/76 do Estado de São Paulo.

Tabela 7 - Padrões de lançamentos de efluentes estabelecidos pelas legislações pertinentes.

Parâmetro	Unidade	CONAMA 430/2011	SSMA 01/89-RS	CONSEMA 128/06-RS	Decreto N° 8468/76-SP
pH		5.0-9.0	6.5-8.5	6.0-9.0	5.0-9.0
Temperatura	°C	<40	<40	<40	<40
DBO	mg O ₂ L ⁻¹	3	N.e	110	60
DQO	mg O ₂ L ⁻¹	N.e	N.e	330	N.e
Sólidos Totais	mg L ⁻¹	500	N.e	125	N.e
Alumínio	mg Al ⁻¹	0,1	10	10	N.e
Cromo total	mg CrL ⁻¹	0,05	0.5	0.5	5.0
Ferro dissolvido	mg FeL ⁻¹	15	10	10	15

Fonte: Autor

As exigências postas pela legislação ambiental a diversas empresas são determinantes no estímulo por métodos mais avançados, os quais viabilizam a eficácia dos processos fabris e contribuem, conseqüentemente, com a preservação ambiental. Todavia, nem todos obedecem aos padrões exigidos, podendo comprometer a proteção dos recursos naturais, além de causar danos à saúde humana. Dessa maneira, torna-se cada vez mais imprescindível a realização de monitoramentos nas indústrias por parte das entidades governamentais, a fim de ditarem penalidades a todos aqueles que descumprirem ou desrespeitarem as leis ambientais vigentes (PEREIRA, 2012).

3.3 MICRO-ORGANISMO SELECIONADO E SUBSTRATO ALTERNATIVO

3.3.1 MICRO-ORGANISMO SELECIONADO: *Cunninghamella elegans*

Os fungos representam um dos mais diversificados grupos dos seres vivos, com membros abrangendo um ampla gama de estilos de vida, formas, habitats e tamanhos. Cerca de 100.000 espécies de fungos já foram descritas, e estima-se que pode haver 1,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos existentes. (HIBBETT *et al.*, 2011). Incluem organismos eucarióticos, heterotróficos (dependentes de processos enzimáticos para quebrar biopolímeros) que são então absorvidos para a nutrição.

Nos fungos a reprodução ocorre por meio de esporos podendo ser assexuada e sexualmente (Alexopoulos *et al.*, 1996). Contudo manifestação de mais de um tipo de morfologia reprodutiva por uma única grupo tem sido um grande desafio para taxonomistas em nomear e classificar-los naturalmente. (WEBSTER; WEBER; 2007).

Tradicionalmente, os fungos podem ser incluídos nos filos Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, e fungos mitospórico (Hawksworth *et al.*, 1995), porém com a introdução de novas técnicas de biologia molecular, à medida que estudos bioquímicos, morfológicos, ultra-estruturais e principalmente moleculares, avançaram apontando diferenças, muitas modificações têm sido introduzidas no sistema de identificação dos fungos e na classificação taxonômica.

O fungo *Cunninghamella elegans* pertencem a classe Zygomycetes que é dividida em duas ordens principais: ordem Entomophthorales e Mucorales; e os fungos desta ordem estão distribuídos em seis famílias diferentes: *Cunninghamellaceae*, *Mortierellaceae*, *Saksenaceae*, *Syncephalastraceae*, *Mucoraceae* e *Thamnidaceae* (RIBES *et al.*, 2000). Na figura 10 são expressas as nomenclaturas taxonômicas da *Cunninghamella elegans*, importantes para a análise e aplicação desta espécie no meio científico, biotecnológico.

A classe dos Zygomycetes, compreende cerca de 770 espécies, possui representantes que habitam diferentes ambientes, tais como: água, solo, fezes, grãos estocados, frutos, folhas, outros fungos, animais vertebrados e invertebrados (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). A estrutura vegetativa dos fungos pertencentes a essa classe possui como características principais: hifas cenocíticas com septos (para diferenciar as estruturas reprodutivas). O Filo Zygomycota compreende todos os fungos que produzem

zigósporo (que é um zigoto), contido em um zigosporângio de parede espessa.

O processo de reprodução dos Zygomycetes ocorre de forma assexuada, através da produção de esporangiosporos, ou sexuada, por copulação gametangial; que envolve a fusão de hifas gaméticas (ou gametângios) culminando com a formação do zigósporo dentro de um zigosporângio, que origina o esporangióforo germinal em cujo esporângio são formados os meiósporos. As espécies são, em geral, monóicas ou sexualmente indiferenciadas, podendo ser homotáticas ou, mais comumente, heterotáticas. (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

O gênero *Cunninghamella* está presente na classe dos Zygomycetes; ele exibe colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação, formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangíolos. Seu micélio, quando jovem, não exibe septo; a presença septação nas hifas está associada à idade da cultura (FREITAS SILVA *et al.*, 2007).

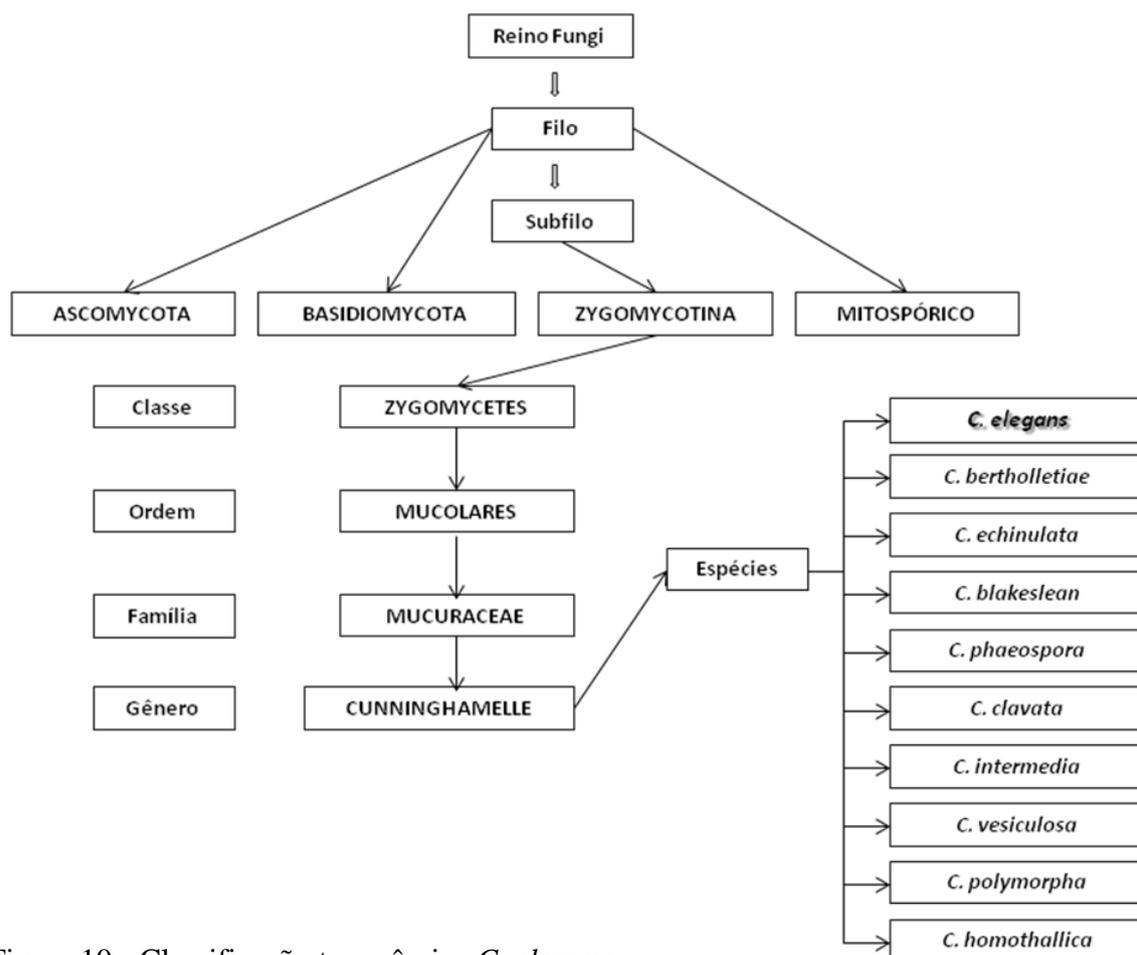


Figura 10 - Classificação taxonômica *C. elegans*

Fontes: Hibbett *et al.* (2007), Adaptado de Hollman *et al.* (2008).

Estudos taxonômicos a respeito do gênero *Cunninghamella* baseiam-se em aspectos morfofisiológicos, contudo as espécies *C. elegans* e *C. bertholletiae*, particularmente, apresentam estruturas reprodutivas similares, dificultando conseqüentemente a identificação. Novos recursos surgem para auxiliar a taxonomia morfofisiológica, a exemplo do estudo com marcadores bioquímicos; esta metodologia tem contribuído para a resolução de vários problemas relacionados à classificação e aspectos filogenéticos (BLAKRISHNAN, 2002).

O *Cunninghamella* tem como característica a presença de quitina e quitosana em sua parede celular, podendo ser encontrado em vários ambientes, como dunas, pradarias, turfeiras, sedimento de estuários, solos de deserto, águas poluídas, sedimento de estuários, entre outros substratos orgânicos. Este possui mais de 12 espécies descritas, sendo caracterizado por causar patologias conhecidas como zigomicoses, podendo também, na sua maioria, ser constituído de espécies sapróbias, utilizando matéria orgânica, como substrato, é o caso da espécie *Cunninghamella elegans* (GOMES *et al.*, 2000).

O fungo *Cunninghamella elegans* é citado na literatura pela sua habilidade de remoção de xenobióticos (AMBRÓSIO; TAKAKI, 2004; AMBRÓSIO *et al.*, 2012).

A biomassa de *Cunninghamella elegans* apresenta elevada quantidade de quitina na parede celular o que demonstra a sua capacidade de remoção e descoloração de corantes azo reativos, (AMBRÓSIO *et al.*, 2012). *C. elegans* também é citado em processos de biossorção de metais pesados (FRANCO *et al.*, 2004; SOUSA, 2005).

Diferentes poluentes podem ser removidos dos efluentes líquidos, utilizando a quitosana derivadas de fungos na remoção de: cátions metálicos, corantes, fenóis, entre outros poluentes. Dentre o uso de fungos o uso de polissacarídeos isolados como quitina e quitosana são amplamente utilizados para a remoção de várias poluentes, inclusive de águas residuárias, demonstrando ser um biossorbente muito atrativo pela sua excelente capacidade de adsorção, destacando-se os íons metálicos e corantes (BHATNAGAR 2009). Neste sentido, vários trabalhos demonstram a aplicabilidade de quitosana microbiológica obtida de fungos da classe Zygomycetes, ordem Mucorales, na descoloração de azo corantes utilizados na indústria têxtil, considerando a presença de quitosana (AMBRÓSIO e CAMPOS-TAKAKI, 2004; SILVA *et al.*, 2013).

Destacam-se ainda, as inúmeras aplicações da quitosana devido as propriedades de adsorção e complexação utilizadas na remoção de corantes e íons metálicos em efluentes

industriais (PERJU e DRAGAN, 2010; CHATTERJEE et al., 2011; LING et al., 2011; AUTA e HAMEED, 2013).

O alto conteúdo de grupos amino e grupos funcionais hidroxilas da quitosana, demonstra o seu significativo potencial para a adsorção remoção de diferentes poluentes aquáticos, a utilização da quitosana e seus derivados vem ganhando grande atenção como biossorventes eficaz e também aos baixo custo tornando o processo econômico (GUIBAL, 2004; BHATNAGAR, 2009).

Considerando as propriedades químicas estruturais da biomassa de *Cunninghamella elegans*, ensaios como uso de adsorvente no processo de remoção de metais pesados, sob condições apropriadas, representariam uma nova promissora alternativa para a remediação de problemas ambientais.

3.3.2 Substrato Agroindustrial Alternativo: Milhocina

O cultivo de milho no Brasil em 2010, segundo o IBGE foi de 40 milhões de toneladas, resultado bastante positivo apresentado por agricultores do centro-sul do país. Com o auxílio de técnicas avançadas, profissionais deste ramo vêm registrando o aumento gradual dos altos rendimentos, comprovando, dessa maneira, a grande demanda e disponibilidade de milho no mercado. O estado do Paraná é um dos maiores produtores de milho, com uma safra anual de cerca de 12 milhões de toneladas (ABIMILHO, 2011).

As indústrias que realizam o beneficiamento do milho por um processo a seco, através dele, retiram o gérmen do grão e o reutilizam na indústria alimentícia, na produção de canjicas, cereais etc. Já no processo por via úmida, o grão de milho é macerado e o amido retirado, sendo este utilizado na fabricação de vários produtos, a exemplo da cerveja. Este processo dá origem ao efluente conhecido como água de maceração ou milhocina, o qual contém grande quantidade de matéria orgânica (ABIMILHO, 2011).

Subprodutos são aqueles provenientes de um processamento industrial, onde se pode produzir um novo produto a partir deste. Uma maior utilização é limitada pela falta de conhecimento da composição química, viabilidade econômica e garantia de segurança alimentar e ambiental dos subprodutos industriais (MENEGUETTI; DOMINGUES, 2008).

A milhocina, também chamada de *corn steep liquor*, é um subproduto do beneficiamento de milho; *um* substrato de baixo custo, é considerada uma excelente fonte de

carbono e/ou nitrogênio, além de conter em sua composição: aminoácidos, vitaminas e sais minerais (Tabela 07). Estudos estão sendo desenvolvidos para adicioná-la a processos fermentativos, servindo como fonte de nutrientes para microrganismos. Além disso, ela vem sendo bastante utilizada como complemento na fabricação de ração para aves e ruminantes (AMARTEY; LEUNG, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2001).

A milhocina apresenta algumas desvantagens entre estas estão: a alta concentração de matéria orgânica apresentada em sua composição, a qual quando não tratada corretamente pode ocasionar a morte de animais aquáticos; a sua variável composição, a qual depende da qualidade do grão de milho e do seu processamento; além da inviabilidade gerada pelo alto custo em sua produção (LIGGETT; KOFFLER, 1998). Na tabela 8 estão presentes os componentes nutricionais da milhocina.

Tabela 8 - Componentes nutricionais da milhocina

COMPOSIÇÃO BÁSICA						
AMINOÁCIDOS	(%)	VITAMINAS	(mg/Kg)	MINERAIS	(mg/Kg)	(%)
Alanina	9,83	Biotina	0,3	Cálcio		0,14
Arginina	3,68	Colina	3,500,0	Cobre	15,0	
Áspártico	5,82	Inositol	6.000,0	Ferro	100,0	
Cisteína	2,20	Niacina	80,0	Manganês	20,0	
Ac. Glutâmico	18,07	Piridoxina	9,0	Manganês		0,6
Triptófano		Riboflavina	6,0	Potássio		2,8
Glicina	5,27	Tiamina	3,0	Sódio		0,1
Histidina	3,72	Ácido Pantotênico	15	Fósforo		1,8
Isoleucina	3,07			Selênio	0,3	
Leucina	8,28			Zinco	60,0	
Lisina	4,75			Enxofre		0,6
Tirosina	3,09					
Metionina	1,98					
Fenilalanina	2,85					
Prolina	9,64					

Fonte: SILVEIRA *et al.* (2001)

Considerando atualmente uma crescente exigência de qualidade nos processos de beneficiamento do couro bem como uma tendência dos consumidores optando por produtos mais ambientalmente responsáveis, foi essencial para que as empresas comecem a se adaptar a este novo paradigma de mudanças no processo de produção. Uma vez que os métodos tradicionais vem acarretando uma série de danos impactante sobre o ambiente e a saúde (ALVES, *et al.* 2008).

Assim, de uma forma mais ampla, a busca pelo desenvolvimento de processos de produção de couro mais limpa, bem como, a melhoria da qualidade da matéria-prima tornam-se cada vez mais importantes, exigindo avanços tecnológicos nos processos de

tratamento do couro, de modo a substituir o uso de substâncias xenobióticas, especialmente o cromo; como também para o cumprimento de normas ambientais por meio do desenvolvimento de métodos de tratamento e recuperação dos efluentes gerados pela indústrias do couro.

4. Referências Bibliográficas

ABIMILHO. **Associação Brasileira das Indústrias de Milho**. 2011. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

ACEVEDO, A. *et al.* Analytical speciation of chromium in in-vitro cultures of chromateresistant filamentous fungi. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 392, p. 269-276, 2010.

AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D.. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource Technology**. v. 98, n. 12, p. 2243-2257, 2007.

AJMAL, M. *et al.* Removal and recovery of heavy metals from electroplating wastewater by using Kyanite as an adsorbent, **Journal of Hazardous Materials**. v. 87, n. 1-3, p. 127-137, 2010.

AKTHAR, M. N.; SASTRY, K. S.; MOHAN, P. M. Mechanism of metal ion biosorption by fungal biomass. **Biometals**. n. 9, p. 21-28, 1996.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley and Sons, 1996.

ALI, I.; ASIM, M.; KHAN, T. A. Low cost adsorbents for the removal of organic pollutants from wastewater. **Journal of Environmental Management**, v. 113, p. 170-183, 2012.

ALIDOKHT, L. *et al.* Reductive removal of Cr (VI) by starch-stabilized Fe⁰ nanoparticles in aqueous solution. **Desalination**, v. 270, n. 1, p. 105-110, 2011.

ALVES, V. C.; RENOFIO, A.; BARBOSA, A. D. S. The leather industry and its environmental impact: subsidies for the implementation of environmental management actions. 2008.

AMARTEY, A.; LEUNG, J. **Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* t-13**. v. 19. Londres: Bulletin of the Chemists and Technologists, 2000. Disponível em: <http://www.mjcce.org.mk/PDF/19_1_164.pdf>.

Acesso em: 25 nov. 2011.

AMBRÓSIO e CAMPOS-TAKAKI, 2004; AMBRÓSIO ST, CAMPOS-TAKAKI GM. Decolorization of reactive azo dyes by *cunninghamella elegans* UCP 542. *Bioresource Technology*, v.9. p.169-75, 2004.

AMBRÓSIO, S. T. *et al.*. A biosorption isotherm model for the removal of reactive azo dyes by inactivated mycelia of *Cunninghamella elegans* UCP542. *Molecules*, v. 17, n. 1, p. 452-462, 2012.

ARAVINDHAN, R.; MADHAN, B.; RAO, J.; NAIR, B. Recovery and reuse of chromium from tannery wastewaters using *Turbinaria ornata* seaweed, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* v. 79, p. 1251-1258, 2012.

AUTA, M. HAMEED, B..H. Coalesced chitosan activated carbon composite for batch and fixed-bed adsorption of cationic and anionic dyes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v.105, p.199-206,2013.

BAJGAI, R. C.; GEORGIEVA, N.; LAZAROVA, N. Bioremediation of Chromium ions with filamentous Yeast *Trichosporon cutaneum* R57. *Journal of Biology and Earth Sciences*, v. 2, n. 2, p. B70-B75, 2012.

BALAKRISHNAN, P. A; ARUNAGIRI, A; RAO, P.G. Ozone generation by silent electric discharge and its application in tertiary treatment of tannery effluent. *Journal of Electrostatics*, Elsevier, v. 56, p. 77-86 2002.

BARKAY, T.; SCHAEFER, J.. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, n. 3, p. 318-323, 2001.

BELLO, J. F. Matéria-prima, qualidade urgente - fase 2. *Revista do couro*. Estância Velha-RS, n. 92, p.30-37, 1993.

BHATNAGAR, A.; SILLANPÄÄ, M. Applications of chitin-and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater—A short review. *Advances in colloid and interface science*, v. 152, n. 1, p. 26-38, 2009.

BISHNOI, N. R. *et al.* Biosorption of Cr(III) from aqueous solution using algal biomass *Spirogyra* spp., **Journal of Hazardous Materials**, v. 145, n. 1-2, p. 142-147, 2007.

BORBA, F. H. **Aplicação dos processos foto – fenton e eletrofloculação no tratamento de efluente de curtume.** Tese de Mestrado em Engenharia Química pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2010.

BRASIL. Ministério do trabalho. **NR 25.** Portaria nº 227, de 24 de maio de 2011. Sindicato da Indústria de Milho e Soja do Estado de São Paulo, SP. Disponível em: <http://www.fiesp.com.br/sindicato/sindindmilhosoja_08/downloads/circulares/2011/circular%20sindmilhosoja%2028-%2011.pdf> Acesso em: 04 out. 2011.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 375, 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 167, p. 141-146, 30 ago. 2006. Seção 1.

BRENNER, G. **A indústria de calçados no Brasil:** trabalho, competição e produtividade. Dissertação de Mestrado em Economia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1990.

CARNEIRO, D. A.; GARIGLIO, L. P.; A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos **Revista Tecer** - Belo Horizonte – v. 3, n. 4, 2010.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Nota técnica sobre tecnologia de controle:** curtumes – NT 14. São Paulo, 2005

CHATTERJEE, S.; CHATTERJEE, T.; LIM, S.R. Adsorption of a cationic dye, methylene blue, on to chitosan hydrogel beads generated by anionic surfactant gelation. *Environmental Technology*, v.32, p.1503-14. 2011

CLAAS, I. C.; MAIA, R. A. M.. **Manual básico de resíduos industriais de curtume.** Porto Alegre: SENAI/RS, 1994.

COELHO, T. L.. **Estudos de adsorção de Cobre (II) em microesferas de quitosana**

reticuladas com epiclorigrina e impregnadas com heparina. Dissertação de Mestrado pelo curso de pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

COSSICH, E. S.; TAVARES, C. R. G. **Biossorção de cromo:** uso da biossorção na remoção de cromo de efluente de curtumes. Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Engenharia Química. Maringa-PR-Brasil, 2000.

CUNHA, A. M. *et al.* **Couro e calçados:** relatório de acompanhamento setorial. São Paulo: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial – ABDI; Núcleo de Economia Industrial e da tecnologia do Instituto de Economia da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, v. 4, p. 4, 2009.

CZAKO-VER, K. *et al.* Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. **FEMS Microbiol Lett.** v. 178, p. 109-115, 1999.

DABROWSKI, A. Adsorption-from theory to practice. **Advances in colloid and interface Science**, v. 93, p. 135-224, 2001.

DALCIN, M. G., *et al.* Evaluation of hexavalent chromium removal in a continuous biological filter with the use of central composite design (CCD). **Journal of environmental management**, v. 92, n. 4, p. 1165-1173, 2011.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A.. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae, **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4311-4330, 2003.

DESJARDIN, V. *et al.* Effect of microbial activity on the mobility of chromium in soils. **Waste Manag.** v. 22, p. 95-200, 2002.

DETTMER, A. **Recuperação do cromo das cinzas do tratamento térmico de resíduos da indústria calçadista visando o curtimento de peles.** Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2008.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, nº 714, p. 1-17, 2000.

DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Science**, v. 2, n. 5, p.112-118, 2007.

EMBRAPA – PECUÁRIA SUDESTE. **Técnicas de tratamento e reuso de água de curtume**. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/node/444>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

FAO. **World statistical compendium for raw hides skins, leather and leather footwear 1988-2007**. Rome (Italy): Food and Agriculture Organization of the United nations, 2008.

FERRAZ, A.; TAVARES, M.; TEIXEIRA J.. **Utilização de sub-produtos da indústria cervejeira na remoção de crômio trivalente de soluções aquosas**, Tese de Doutorado em Engenharia Química e biologia pela Escola de Engenharia Universidade do Minho, 2007.

FRANCISCO, R.; ALPOIM, M. C.; MORAIS, P. V. Diversity of chromium – resistant and reducing bacteria in a chromium – contaminated activated sludge. **J Appl Microbiol**. v. 92, p. 837–843, 2002.

FRANCO, L. D. O. *et al.* Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 243-247, 2004.

FRANCO, O. L. *et al.* Heavy metal Biosorption by Chitin and Chitosan Isolated from *Cunninghamella elegans* (ifm), **Brasillian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 243-247, 2004.

FREITAS SILVA, M. C. *et al.* Effect of enviromental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP542 Using Factorial Design. **Asian Chitin Journal**. v. 3, p. 15-22, 2007.

GADD, G. M. Fungi and Yeast for Metal Accumulation in Microbial Mineral Recovery. In.: LEHRLICH, H. L.; Bierley, C. L. (Eds.). **Environmental Biotechnology**. New York: McGraw Hill, 1990, p. 249-275.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation, **Geoderma**, v. 122, n. 2-4, p. 109-119, 2004.

GANEN. **Certificações Ambientais acerca do couro.** 2007. Disponível em: <http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/1281/curtumes_aspectos_senna.pdf?squence=1>. Acesso em: 19 mai. 2012.

GARG, U. K. *et al.* Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by agricultural waste biomass, **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, n. 1-2, p. 60-68, 2007.

GAVRILESCU, M.. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 3, p. 219-232, 2004.

GOMES, P. F. *et al.*. Aspectos da qualidade de ecossistemas do Município de Rio Formoso. **International Conference- Sustainable use of estuaries and mangroves: challenges and prospects.** 2000, p. 82.

GOYAL, N.; JAIN, S. C.; BANERJEE, U. C. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. **Advances in Environmental Research**, v. 7, n. 2, p. 311-319, 2003.

GUAN, L. *et al.* Equilibrium sorption of Cr⁶⁺ by a consortia of denitrifying bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 7, p. 727-732, 1993.

GUPTA, R. *et al.* Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. **Curr Sci.** v. 78, p. 967-973, 2000.

GUPTA, S; SATPATI, S; NAYEK, S; GARAI, D. Effect of waste water irrigation of vegetables in relation to bioaccumulation of heavy metals and biochemical changes, **Environmental Monitoring Assessment**, v. 165, p. 169-177, 2010.

HAWKSWORTH, D. L., KIRK, P. M., SUTTON, B. C.; PEGLER, D. N. AINSWORTH & BISBY, S. Dictionary of the fungi. CAB International. *International Mycological Institute.* Egham, Surrey. 1995. 616p.

HIBBETT, D. S., OHMAN, A., GLOTZER, D., NUHN, M., KIRK, P.; NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25(1), 38-47, 2011.

HIBBETT, D. *et al.*. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res.** v. 111, p. 509-547, 2007

HU, C. Y. *et al.*. Treatment of high fluoride-content wastewater by continuous electrocoagulation-flotation system with bipolar aluminum electrodes. **Separ. Purific. Technol.**, v. 60, p. 1-5, 2008.

ISO 9000. **logística de comercio exterior**. Disponível em: <<http://www.cotry.com.br/>>. Acesso em: 01 fev. 2013.

JAMES, M.; DONNELL, K. C. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. **Mycologia**, v. 98, p. 872-884, 2006.

JOST, P.T. **Tratamento de efluentes de curtume**. Rio de Janeiro: Confederação Nacional da Indústria, 1996.

KALYANI, S.; RAO, P. S.; KRISHNAIAH, A. Removal of nickel(II) from aqueous solutions using marine macroalgae as the sorbing biomass, **Chemosphere**, v. 57, n. 9, p. 1225-1229, 2004.

KANTH, S. V. *et al.*. Cleaner tanning practices for tannery pollution abatement: Role of enzymes in ecofriendly vegetable tanning. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, n. 5, p. 507-517, 2009.

KAPOOR, A; VIVRARAGHAVAN, T. Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. **Bioresour Technol.** v. 63, p. 109–113, 1998.

KELLER, W.; CHERNICHARO, C. A. O Cromo nos Resíduos Sólidos de Curtumes. Imobilização em Materiais Cerâmicos. *In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental.* p.1759-1768, 2005.

KOLPIN, D. W. *et al.* Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science Technology**, v. 36, p. 1202-1211, 2002.

LANGANKE, R. **Conservação para ensino médio**. Disponível em:

<http://eco.ib.usp.br/lepac/conservacao/ensino/lixo_residuos.htm. Acesso em: 20 nov. 2011.

LIGGETT, W. R.; KOFFLER, H. **Corn steep liquor in microbiology**. Universidade Lafayet. v. 12. U.S.A. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180696/pdf/bactrev00003-0030.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2011.

LING, S.L.Y.; YEE, C.Y.; ENG, H.S. Removal of a Cationic Dye using Deacetylated Chitin (Chitosan). *Journal Applied Sciences*. v.11, p.8, p.1145-1148. 2011

LLOYD, J. R. Microbial reduction of metals and radionuclides, **FEMS Microbiology**, v. 27, p. 411-425, 2003.

LOPEZ, A. *et al.*. Nickel biosorption by free and immobilized cells of *Pseudomonas fluorescens* 4F39: A comparative study. **Water Air and Soil Pollution**, v. 135, n. 1-4, p. 157-172, 2002.

LUCAS, A. *et al.*. Fermentation of agro-food wastewaters by activated sludge, **Water Research**, v. 41, p. 1635-1644, 2007.

MALIK, A.. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 261-278, 2004.

MARTINES, M. A. **Impacto do lodo de curtumes nos atributos biológicos e químicos do solo**. Dissertação de mestrado pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo, 2005.

MEJARE, M.; BULOW, L.. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 67-73, 2001.

MENEGUETTI C. C.; DOMINGUES J. L. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. **Revista eletrônica Nutritime**, v. 5, n. 2, p. 512-536, março/abril 2008. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/052V5N2P512_536_MAR208.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2011.

MIDDLETON, S. S. *et al.* Cometabolism of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1 produces cell-associated reduced chromium and inhibits growth. **Biotechnol Bioeng**. v. 83, p. 627- 637, 2003.

MORALES, L.; ELISEO, B.; URBINA, C. Hexavalent Chromium Removal by a *Trichoderma inhamatum* Fungal Strain Isolated from Tannery Effluent., **Water Air Soil Pollut**, v. 187, p. 327–336, 2010.

NAMASIVAYAM, C.; SURESHKUMAR, M.. Removal of chromium (VI) from water and wastewater using surfactant modified coconut coir pith as a biosorbent, **Bioresourse Tecnology**, v. 99, p. 2218-2225, 2008.

NJIKI, C. P. N. *et al.*. Mercury(II) removal from water by electrocoagulation using aluminium and iron electrodes. **J. Hazard. Materials**, v.168, p. 1430-1436, 2009.

NOURBAKHSI, M. *et al.*. A comparative study of various biosorbents for removal of chromium(VI) ions from industrial wastewaters. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 1-5, 1994.

PACHECO, J. W. **Curtumes**. São Paulo: CETESB, (1 CD) : il. ; 30 cm. (Série P +L) P. 76, 2005.

PALÁCIO, M. S. *et al.*. Toxicity assessment from electro-coagulation treated-textile dye wastewaters by bioassays. **J. Hazard. Materials**, v. 172, p. 330-337, 2009.

PALMIERI, M. C.; VOLESKY, B.; GARCIA, O. Biosorption of lanthanum using *Sargassum fluitans* in batch system. **Hydrometallurgy**, v. 67, n. 1-3, p. 31-36, 2002.

PANDAY, K. K.; PRASAD, G.; SINGH, V. N. Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by adsorption on fly ash-wollastonite. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 34A, p. 367-374, 1984.

PEREIRA, A. R. B. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental (REGET)**, v. 6, n. 6, p. 995-1006, 2012.

PERJU, M. M., DRAGAN, E. S. Removal of azo dyes from aqueous solutions using chitosan based composite hydrogels. **Ion Exchange Letters**. v.3, p. 7-11. 2010.

PIETROBELLI, J. M. T. A. *et al.*. Cadmium, Copper and Zinc Biosorption Study by Non-Living *Egeria densa* Biomass. **Water Air Pollut** , p. 385-392, 2009.

PINTO, G. A. S. *et al.*. Aplicação de microrganismos no tratamento de resíduos: A remoção de metais pesados de Efluentes Líquidos. **Revista Methodus**. n. 5, 2004.

QUINTELAS, C.. **Implementação e desenvolvimento de sistemas para a fixação de metais pesados**. Teses de doutorado em engenharia Química e Biológica pela Universidade do Minho. 2007

RAO, J. R. *et al.*. Recouping the wastewater: a way forward for cleaner leather processing. **Journal of Cleaner Production**, 2003.

REIS, M. A. M.; ALMEIDA, J. S.; ZUNGAILIA, E. J. Biorremediação. *In.*: LIMA, N.; MOTA, M. (Eds.). **Biociencia**: fundamentos e aplicações. Lisboa: Lidel, 2003, p. 285-300.

REMOUDAKI, E. *et al.* The mechanism of metals precipitation by biologically generated alkalinity in biofilm reactors, **Water Research**, v. 37, n. 16, p. 3843-3854, 2003.

RIBEIRO, I. C. M. *et al.*. O cromo e o meio ambiente. **Seminário metais pesados**. Centro Universitário Franciscano (UNIFAE), Departamento de Química Ambiental. Curitiba – PR. 2009. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAACO0AF/cromo-meio-ambiente>>. Acesso em: 22 nov. 2011.

RIBES, J.A.; VANOVER-SAMS, C. L.; BAKER, D. J. Zygomycetes in human disease. **Clin Microbiol Ver.** v. 13, p. 236-301, 2000.

ROCHA, E. R. L.; MARCATO, V. J.; COSSICH, E. S. Biossorção de cromo por biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. *In.*: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. jul. 2005. Campinas – SP, 2005.

ROSA, M.F. **Couro**: história e arte. 2003.

ROSTAMI, K.; JOODAKI, M. R., Some studies of cadmium adsorption using *Aspergillus niger*, **Penicillium austurianum**, 2002.

RUPPENTHAL, J. E. **Perspectivas do setor couro do Estado do Rio Grande do Sul**. Tese de Doutorado em Engenharia de Produção pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 2001.

SAG, Y. Biosorption of heavy metals by fungal biomass and modeling of fungal biosorption: A review, **Separation and Purification Methods**, v. 30, n. 1, p. 1-48, 2001.

SAG, Y.; KUTSAL, T. Application of adsorption isotherms to chromium adsorption on *Z. ramigera*. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 2, p. 141-144, 1989.

SAG, Y.; KUTSAL, T. The selective biosorption of chromium(VI) and copper(II) ions from binary metal mixtures by *R. arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 561-572, 1996b.

SAG, Y.; KUTSAL, T. Fully competitive biosorption of chromium(VI) and iron(III) ions from binary metal mixtures by *R. arrhizus*: use of the competitive Langmuir model. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 573-585, 1996a.

SAG, Y.; YALCUK, A.; KUTSAL, T.. Mono and multi-component biosorption of heavy metal ions on *Rhizopus arrhizus* in a CFST, **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 787-799, 2000.

SANI, R. K.; PEYTON, B. M.; BROWN, L. T. Copper – induced inhibition of growth of *Desulfovibrio dusulfuricans* G-20: Assessment of its toxicity and correlation with those of Zinc and lead. **Appl Environ Microbiol.** v. 67, p. 4765–4772, 2001.

SANTOS, A. M. M. M. *et al.* Panorama do setor de couro no Brasil. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 57 84, set./2002. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set1603.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

SAUER, T. P.; CASARIL, L.; OBERZINER, A.L.B.; MOREIRA, R.F.P.M.. Advanced oxidation processes applied to tannery wastewater containing Direct Black 38 – Elimination and degradation kinetics. **Journal Hazardous Materials**, article in press, 2006.

SCHLLEMER, M. A. *et al.* Precipitação química e encapsulamento no tratamento e destinação de resíduos líquidos contendo Cromo. *In: Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente*, 3. 2012, Bento Gonçalves, Anais...Bento Gonçalves: Fiema. 2012.

SCHRANK, S. G. *et al.* Elucidation of the behavior of tannery wastewater under advanced oxidation conditions. **Chemosphere**, v. 56, p. 411-423, 2004.

SELVI, K.; PATTABHI, S.; KADIRVELU, K.. Removal of Cr(VI) from aqueous solution by adsorption on to activated carbon, **Bioresour. Technol.** v. 80, p. 87–89, 2001.

SHARMA, D. C.; FORSTER, C. F. Removal of hexavalent chromium using sphagnum moss peat. **Wat. Res.**, v. 27, n. 7, p. 1201-1208, 1993.

SHARMA, S.; ADHOLEYA, A. Detoxification and accumulation of chromium from tannery effluent and spent chrome effluent by *Paecilomyces lilacinus* fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 2, p. 309-317, 2011.

SHRIVASTAVA, A. K. A review on copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies. **Indian Journal of Environmental Protection**, v. 29, p. 552-560, 2009.

SHUGABA, A. Uptake and Reduction of Hexavalent Chromium by *Aspergillus niger* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, 2012.

SHUGABA, A. *et al.* Studies on some growth related changes in cultures of *Aspergillus niger* and *Aspergillus parasiticus* treated with hexavalent chromium and tannic acid. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**. v. 7, p. 251-264, 2011.

SHUGABA, A. *et al.* Bioremediation of hexavalent chromium and tannic acid in synthetic tannery wastewater using free and calcium–alginate immobilized spores and mycelia of *Aspergillus niger* and *Aspergillus parasiticus*. **Bioremediat J.** v. 14, p. 142-149, 2010.

SILVA, A. C. F. **Redução do Cromo Hexavalente pelo Processo Foto-fenton** Dissertação de mestrado em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Itajuba. Minas Gerais, 2011.

SILVA, C. S.; PEDROZO, M. M. F. **Ecotoxicologia do Cromo e seus Compostos**. Salvador: CRA, 2001 (Serie: Cadernos de Referencia Ambiental, v. 5).

SILVA, T.A.L., TAMBOURGI, E.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M., Inorganic polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans* (UCP 542) and its influence in the decolorization of textile azo dye Orange II. *Clean Technology Environmental Policy*, v15, p.179-184, 2013

SILVEIRA, M. M. *et al.*. Production of glucose- fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 55, p. 442-445, 2001.

SILVEIRA, M. W. Horizontes para o couro. **Jornal Exclusivo**. Nova Humburgo, 2009.

SOUZA, F. R. **Aplicação de enzimas no processamento de couros**: comparação entre processos químicos e coenzimáticos. Dissertação pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (RS), 2010.

SOUZA, P. M. D. *et al.*. Copper influence on polyphosphate metabolism of *Cunninghamella elegans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 315-320, 2005

SRINATH, T. *et al.* Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria, **Chemosphere**, v. 48, n. 4, p. 427-435, 2002.

SZE, K. F.; LU, Y. J.; WONG, P. K. Removal and recovery of copper ion (Cu^{2+}) from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5X, **Resources Conservation and Recycling**, v. 18, n. 1-4, p. 175-193, 1996.

TOBIN, J. M.; WHITE, C.; GADD, G. M. Metal accumulation by fungus: applications in environmental biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology**, v.13, p.126-130, 1994.

TSEZOS, M.; REMOUDAKI, E.; ANGELATOU, V.. A Systematic Study on Equilibrium and Kinetics of Biosorptive Accumulation - the Case of Ag and Ni, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 35, n. 1-3, p. 129-153, 1995.

TSEZOS, M.; REMOUDAKI, E.; ANGELATOU, V.. Biosorption sites of selected metals using electron microscopy. **Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology**, v. 118, n. 3, p. 481-487, 1997.

UYSAL, M.; AR, I. Removal of Cr(VI) from industrial Wastewaters by adsorption, Part I: Determination of optimum conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 482-491, 2010.

VALE, M. S. *et al.* Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* isolado de efluente Industrial. **Engenharia Sanitária Ambiental**. Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, July/Sept. 2011.

VANBROEKHOVEN, K., W. DEJONGHE; L. DIELS. Treatment of contaminated soil and groundwater: In situ immobilization of metals. **Soil and sediment remediation**. Mechanisms, technologies, and applications, p. 248-263, 2005

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F.. Removal of metals by biosorption: A review, **Hydrometallurgy**, v. 44, n. 3, p. 301-316, 1997.

VELÁSQUEZ, L.; DUSSAN, J. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus spheoericus*. **Jornal of hazardour materials**, v. 10, p. 1016, 2009.

VIEIRA, P. M. C.. **Utilização de materiais de baixo custo (cascas de camarão) para a remoção de crômio**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química pelo Instituto Politécnico de Bragança e pela Escola Superior de Tecnologia e de Gestão. Bragança, 2009.

VIEIRA, R. H. S. F.; VOLESKY, B. Biosorption: a solution to pollution? **International Microbiology**, v. 3, p. 17-24, 2000.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, v. 59, n. 2-3, p. 203-216, 2001.

VOLESKY, B.. Equilibrium biosorption performance, *in* Sorption and Biosorption, **BV-Sorvex, Inc**, Quebec, p. 103-116, 2004.

WEBSTER, J.; WEBER, R. *Introduction to fungi* (Cambridge: Cambridge University Press), v. 667, 1980, 841p.

YAN, G. Y.; VIRARAGHAVAN, T. Heavy metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*, **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4486-4496, 2003.

YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. Effect of pretreatment on the bioadsorption of heavy metals on *Mucor rouxii*. **Water SA**, v. 26, p. 119–123, 2000.

YUN, Y. S.; VOLESKY, B. Modeling of lithium interference in cadmium biosorption, **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 16, p. 3601-3608, 2003.

ZOUBOULIS, A. I.; LOUKIDOU, M. X.; MATIS, K. A.. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal polluted soils, **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 909-916, 2004.

ZOUBOULIS, A. I.; MATIS, K. A.; LAZARIDIS, N. K.. Removal of metal ions from simulated wastewater by *Saccharomyces* yeast biomass: Combining biosorption and flotation processes, **Separation Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 349-365, 2001.

CAPÍTULO 2

Molecules **2013**, *18*, 1-x manuscrito; doi:10.3390/molecules180x0000x

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Artigo

Suplementação abundante de aminoácidos no aumento da produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 em fermentação submersa

Ednaldo Ramos dos Santos^{1,3}, Adamares Marques da Silva^{1,3}, Marta Cristina Freitas da Silva^{1,3}, Patricia Mendes de Souza^{2,3}, Antônio Cardoso da Silva³, Clarissa D. C. Albuquerque³, Sergio Carvalho de Paiva³, Kaoru Okada³, G. M. Campos-Takaki³

- 1 Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil; (ERS) santosmestrado@gmail.com; (AMS) adamaresms@yahoo.com.br
- 2 Programa Nacional de Pós-doutorado da CAPES, Universidade Católica de Pernambuco, CEP 50.050-900 Recife, PE, Brasil, (MCFS) martacfs@yahoo.com.br
- 3 Universidade Católica de Pernambuco, Boa Vista 50050-590 Recife, PE, Brasil.(ACS) antoniocardoso2000@yahoo.com.br; (SCP) sergio@unicap.br; (KO) kao@unicap.br ; (GMCT) galba_takaki@yahoo.com.br

* Autor para quem deve ser endereçada a correspondência; E-Mail: galba_takaki@yahoo.com.br Tel.: +55-81-21194044; fax: +55-81-21194043.

Recebido: / Aceito / Publicado em:

Resumo

Estudos foram realizados com *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 avaliando os efeitos de associação sacarose, asparagina e milhocina na produção de biomassa e quitosana em fermentação submersa. As concentrações dos componentes do meio de cultivo foram estabelecidas por um planejamento fatorial completo de 2³ para avaliar as interações e efeitos das variáveis independentes sacarose, asparagina e milhocina, em relação ao conteúdo de carbono e nitrogênio, sob a variável resposta produção de quitosana, relacionada à biomassa. Os resultados obtidos indicaram que os ensaios no ponto central (Asparagina 0,025%,

Sacarose 0,15%, suplementado com 0,45% de Milhocina), com relação C:N de 2:6, observou-se rendimentos máximos de biomassa de 16,95g/L e de quitosana 2,14g/L, com 96 horas de cultivo. O espectro de absorção ao raio infravermelho da quitosana produzida por *C.elegans* apresentou bandas relacionadas ao estiramento axial –OH entre 3406 e 3432 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento N-H; com deformação axial de C=O de amida por volta de 1639 cm^{-1} , deformação angular de N-H em aproximadamente 1560 cm^{-1} ; deformação axial de -CN de amida por volta de 1421 cm^{-1} ; deformação angular simétrica de CH₃ em 1379 cm^{-1} ; deformação axial de -CN de grupos amino entre 1125 a 1250 cm^{-1} e bandas de estruturas polissacarídicas na região entre 890 a 1150 cm^{-1} . O índice de cristalinidade da quitosana foi de 60,92%, com grau de desacetilação de 75,25%. As baixas porcentagens dos substratos sacarose e asparagina suplementados com milhocina no ponto central do planejamento oferecem elevada produção de biomassa e quitosana de baixo custo.

Palavras chaves: *Cunninghamella elegans*; quitosana; sacarose; asparagina; milhocina.

1. Introdução

O gênero *Cunninghamella* exibe colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangióolos. O micélio quando jovem não exibe septo. A septação está associada à idade da cultura [1,2].

A habilidade de catabolizar xenobióticos, em especial compostos aromáticos, drogas farmacológicas e ainda, bio-solver metais pesados, além de realizar biodessulfurização do organosulfurado dibenzotiofeno – DBT fazem do gênero *Cunninghamella* serem importantes na indicação para o estudo de biorremediação em ambientes contaminados [3,4,5,6].

Os nutrientes utilizados para crescimento microbiano dependem de certo balanço das fontes carbono e nitrogênio, com a necessidade de produzir metabólitos secundários. No sentido de aproveitar os resíduos industriais são necessários conhecimentos sobre quantidade e qualidade em carboidratos, proteínas ou lipídios para o uso como substrato para a produção de compostos biotecnológicos [7,8]. Desta forma, a busca por substratos agroindustriais, como fontes renováveis, sendo uma tecnologia alternativa para a produção de biomassa e quitosana, utilizando também importantes parâmetros como velocidade de agitação, temperatura, pH, e principalmente, as fontes de carbono e nitrogênio [9,10,11,12, 13, 14].

Dentre as fontes agroindustriais renováveis, a milhocina é sem dúvida, um dos

subprodutos mais amplamente utilizados. A milhocina é obtida do beneficiamento do milho, rica em compostos aminados, como aminoácidos essenciais, vitaminas, entre outros nutrientes, sendo utilizada como alimento complemento na fabricação de ração para aves e ruminantes. Contudo, a milhocina tem demonstrando ser uma fonte nutricional de baixo custo, atuando efetivamente como fonte de nitrogênio em vários processos fermentativos para obtenção de insumos de elevado valor agregado [15, 16, 17, 18, 19, 20].

Por outro lado, a quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. É sintetizado, principalmente, por fungos, nematódeos e artrópodes. Alguns pesquisadores consideram a quitina como um derivado da celulose porque ambas partem de uma estrutura molecular semelhante [21,22].

Os polímeros quitina e quitosana são considerados homopolissacarídeos biodegradáveis, biocompatíveis, produzidos por fontes naturais, os quais são constituídos por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicosamina e 2-amino-2-deoxi-D-glicosamina, respectivamente unidas por ligações $\beta(1-4)$, diferindo entre si na proporção relativa dessas unidades glicosídicas e quanto a solubilidade [23,24].

A quitosana é um polímero biodegradável de alta massa molecular com várias e importantes aplicações em função de suas principais características como baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e produção a partir de substratos renováveis. É aplicada em diferentes setores, desde área médica e farmacêutica até na agricultura e indústria de alimentos devido a sua versatilidade [25, 26,27].

A quitosana pode ser obtida a partir da desacetilação parcial da quitina proveniente do exoesqueleto de crustáceos, contudo, no processo de obtenção alguns resíduos podem causar problemas alérgicos. Desta forma, a utilização de fungos, principalmente, os da ordem Mucorales, representam grande potencial biotecnológico, considerando o significativo conteúdo de quitina e quitosana em suas paredes celulares [28].

Neste trabalho foram realizadas investigações com a associação dos substratos sacarose, asparagina e milhocina em baixas concentrações na produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 542, no sentido de conhecer a influência da relação 2:6 Carbono: Nitrogênio.

2. Resultados e Discussão

2.1 Efeitos da sacarose, asparagina e milhocina na produção de biomassa e de quitosana

Inicialmente foi investigada a exigência nutricional de *Cunninghamella elegans* em relação aos constituintes do meio sacarose, asparagina e milhocina, considerando a proporção C:N de 2:6, (excesso da fonte de nitrogênio), na produção da biomassa e de quitosana de acordo com as variáveis independentes, como apresentado na Tabela 1. Os resultados obtidos demonstraram que milhocina favoreceu a produção de biomassa, aumentando a relação carbono/nitrogênio em todos os ensaios do planejamento. A maior produção de biomassa e de quitosana foi observada no ponto central do planejamento fatorial completo de 2³, correspondendo a 16,95g/L para biomassa e uma produção excelente de 2,14g/L de quitosana.

Os dados obtidos sugerem que a associação da sacarose e asparagina com a milhocina (asparagina 0,025% e sacarose 0,15% com 0,45% de milhocina) apresenta-se como a melhor condição. O pH inicial variou de 4,01 a 4,66 passando para 5,10 a 5,48. A mudança de pH do meio, contudo permanecendo na faixa ácida sugere condição ótima para a atividade da enzima quitina desacetilase na produção de quitosana, considerando que o pH ótimo da enzima é 4,5, segundo Kafetzopoulos *et al.*, [29]. O aumento de biomassa é explicado considerando o enriquecimento do meio pela presença de aminoácidos (leucina, isoleucina, lisina, metionina, tirosina, fenilalanina, treonina e serina), vitaminas (biotina, colina, inositol, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina e ácido pantotênico), que segundo Bento *et al.*, [30], são fontes nutricionais fundamentais para a produção de biomassa e de quitosana por *C. elegans*.

Tabela 1 - Resultado da produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella elegans* no intervalo de 96h, 150 rpm, seguindo um planejamento fatorial de 2³

Ensaio	pH Inicial	pH Final	Biomassa (g/L)	Quitosana (g/L)
1	4.66	5.30	10,83	0,60
2	4.01	5.10	11,12	1,51
3	4.02	5.46	14,62	1,07
4	4.59	5.09	10,63	1,93
5	4.01	5.48	14,64	2,03
6	4.01	5.40	14,72	1,52
7	4.03	5.37	13,47	1,04
8	4.02	5.15	14,02	1,55
9	4.03	5.44	16,95	2,10
10	4.02	5.21	16,03	2,08
11	4.01	5.50	15,77	2,12
12	4.01	5.29	15,52	2,14

Matriz do planejamento de 2³ para a produção de biomassa e quitosana:
 Asparagina %: -1(0); 0 (0,025); 1(0,05); Sacarose %: -1(0,1); 0(0,15); 1 (0,2);
 Milhocina %: -1 (0,3); 0 (0,45); 1 (6)

Estudos realizados por [30] usando fungo da mesma ordem Mucorales, encontraram 1,19g/L de quitosana com 72h de cultivo, demonstrando resultados inferiores aos produzidos

por *C. elegans* em sacarose, asparagina suplementado com milhocina. Por sua vez, Cardoso, et al., 2012 [20] usando milhocina e mel produzido por abelhas como componentes do meio para produção da biomassa e quitosana por *Rhizopus arrhizus* encontrou rendimentos de 20,61 g/L e 29,3 g/L, respectivamente, sendo este último, inferior ao obtido neste trabalho.

2.2 Avaliação das variáveis independentes na produção de biomassa e de quitosana

Os dados experimentais obtidos neste trabalho foram submetidos à análise estatística para avaliar o efeito dos compontes do meio de cultivo (sacarose, asparagina e milhocina), sob a produção de biomassa e quitosana no ensaio selecionado como de maior rendimento de biomassa e quitosana.

A Figura 1 apresenta o diagrama de Pareto – com nível de confiança de 95%, para estimativa dos efeitos lineares e de segunda ordem em valor absoluto do planejamento fatorial completo 2^3 – tendo como variáveis independentes: (1) asparagina (2) sacarose (3) milhocina e como variável resposta a concentração de biomassa. A magnitude de cada efeito é representada pelas colunas, e a linha transversal às colunas correspondente ao valor de p igual a 0,05 que indica o quão grande deve ser o efeito para ter significado estatístico.

Portanto, pode-se observar que entre os fatores estudados, apenas a milhocina exerceu um efeito estatisticamente significativo sobre o aumento da produção de biomassa. Entretanto a variável independente milhocina (3), quando associada à asparagina (1) influenciaram positivamente para o aumento da biomassa, porém não apresentou um efeito estatisticamente significativo.

Os resultados obtidos sugerem que ocorreu uma melhor adaptação fisiológica de *C. elegans* quando estava presente a milhocina subproduto rico em vitaminas, aminoácidos e sais minerais), provavelmente, devido à milhocina apresentar em sua composição aminoácidos essenciais para a síntese dos constituintes celulares do fungo em estudo. Estes resultados são apoiados pela literatura que descrevem aumento da produção de biomassa de fungos filamentosos, leveduras e bactérias usando a milhocina como fonte essencial na composição dos meios de cultivo utilizados nos processos fermentativos [7, 8].

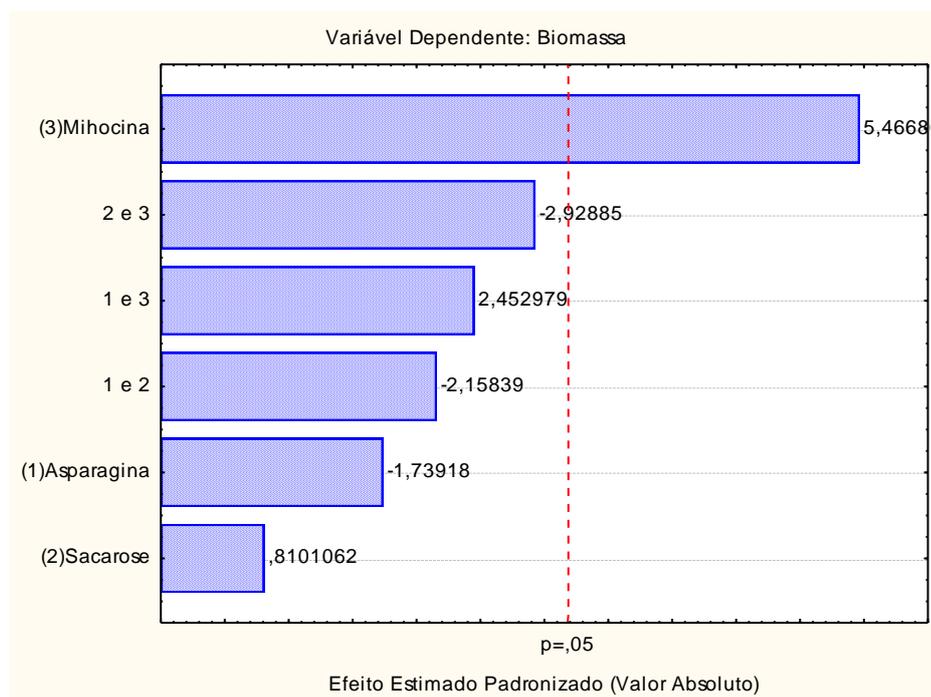


Figura 1- Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^3 , tendo como variáveis independentes: (1) asparagina (2) sacarose (3) milhocina e como variável resposta a concentração de biomassa

A Figura 2 apresenta o diagrama de Pareto com nível de confiança de 95%, para estimativa dos efeitos lineares e de segunda ordem em valor absoluto do planejamento fatorial completo 2^3 – tendo como variáveis independentes: (1) asparagina (2) sacarose (3) milhocina e como variável resposta o rendimento de quitosana. A magnitude de cada efeito é representada pelas colunas, e a linha transversal às colunas correspondente ao valor de p igual a 0,05 que indica o quão grande deve ser o efeito para ter significado estatístico.

A análise do diagrama de Pareto (Figura 2) sugere que, nas condições estudadas, a asparagina, a milhocina e a interação entre a asparagina e a sacarose favoreceram, com significância estatística, o aumento do rendimento de quitosana. Pode-se ainda observar, a interação da sacarose com a milhocina e a interação da asparagina com a milhocina exerceram efeitos negativos altamente significativos do ponto de vista estatístico sobre o rendimento de quitosana. Por outro lado, a sacarose influenciou negativamente para o rendimento de quitosana e ainda não apresentou um efeito estatisticamente significativo.

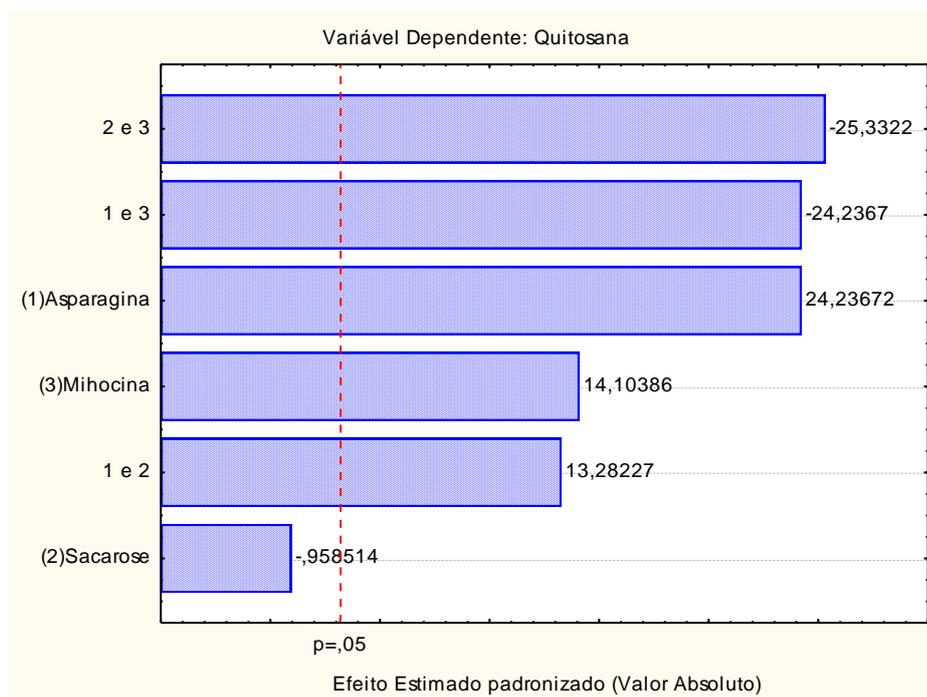


Figura 2 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial completo 2^4 , tendo como variáveis independentes: (1) asparagina (2) sacarose (3) milhocina e como variável resposta o rendimento de quitosana

2.3 Características físico-químicas da quitosana

As caracterizações físico-químicas do polímero isolado estão apresentadas através da difração de raios-X e dos espectros de absorção ao infravermelho (Figuras 2A e 2B). No espectro de absorção ao raio infravermelho observou-se bandas relacionadas ao estiramento axial -OH entre 3406 e 3432 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento N-H; com deformação axial de C=O de amida por volta de 1639 cm^{-1} , deformação angular de N-H em aproximadamente 1560 cm^{-1} ; deformação axial de -CN de amida por volta de 1421 cm^{-1} ; deformação angular simétrica de CH₃ em 1379 cm^{-1} ; deformação axial de -CN de grupos amino entre 1125 a 1250 cm^{-1} e bandas de estruturas polissacarídicas na região entre 890 a 1150 cm^{-1} . Portanto, o perfil dos espectros de absorção ao raio infravermelho apresentado pela quitosana isolada de *C. elegans* são apoiados pela literatura [1, 11,15].

A espectroscopia na região do infravermelho da quitosana obtida por *C. elegans* no ponto central do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 1) e de quitosana comercial (Polymar) foram utilizados para determinar o grau de desacetilação [15]. Os graus de desacetilação de quitosana microbiológica e do padrão Polymar obtidos foram 75,25% e 78,5%, respectivamente, verificando-se que através de espectros na região do infravermelho o grau de

desacetilação da quitosana microbiológica, excede em 3,25% comparada ao padrão comercial. Investigando a utilização de quitosana na remoção de agentes poluidores em efluente têxtil, Silva [14] caracterizou a amostra de quitosana extraída do micélio de *C. elegans* relatando que os graus de desacetilação apresentaram qualidade, ligeiramente, superior ao padrão comercial usado como referência. Em experimento realizado na obtenção de quitosana produzida pelo fungo filamentosso *Rhizopus arrhizus* observando-se grau de desacetilação 88,2%, resultado estatisticamente similar ao obtido neste trabalho [17].

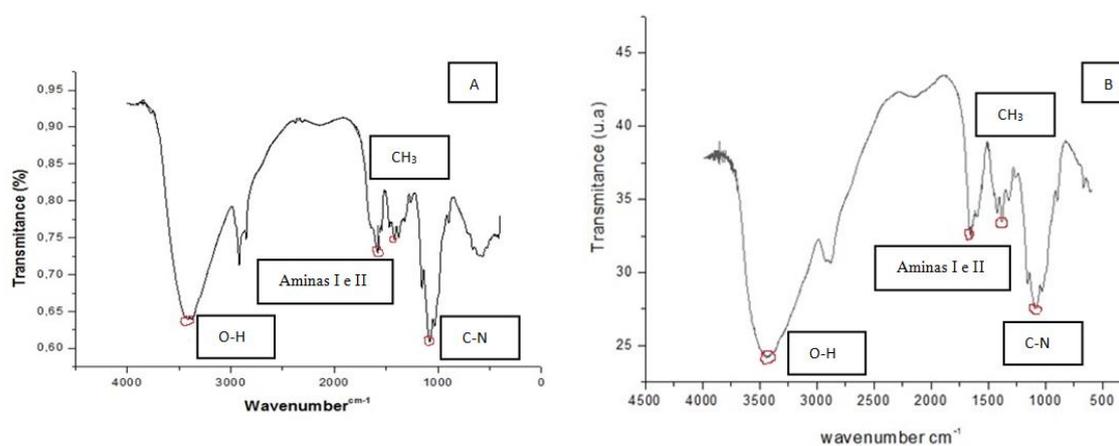


Figura 3. Espectros de absorção ao Infravermelho. (A) Quitosana microbiológica produzida por *Cunninghamella elegans* cultivada no meio sacarose, asparagina e milhocina (C:N; 2:6) e (B) Quitosana comercial

A partir da difração de raios-X, obtida da quitosana microbiológica obtida de *C. elegans* na melhor condição do planejamento fatorial foram calculados o índice de cristalinidade (I_{CR}), sendo obtido resultado igual a 60,92%, superior ao índice de cristalinidade (56,94%), da amostra padrão (Figuras 4A e 4B). Pela análise de difração de raios-X observou-se graus de ordenamento dos polímeros, os quais podem ser influenciados por vários fatores, principalmente, processos de isolamento e liofilização, segundo a literatura [17, 21, 23, 27]. Desta forma, os índices de cristalinidade estão relacionados às propriedades físico-químicas do polímero cujas alterações podem estar relacionadas confirmando o alto grau de desacetilação das quitosanas [24]. Os resultados obtidos neste trabalho estão compatíveis com a literatura [21].

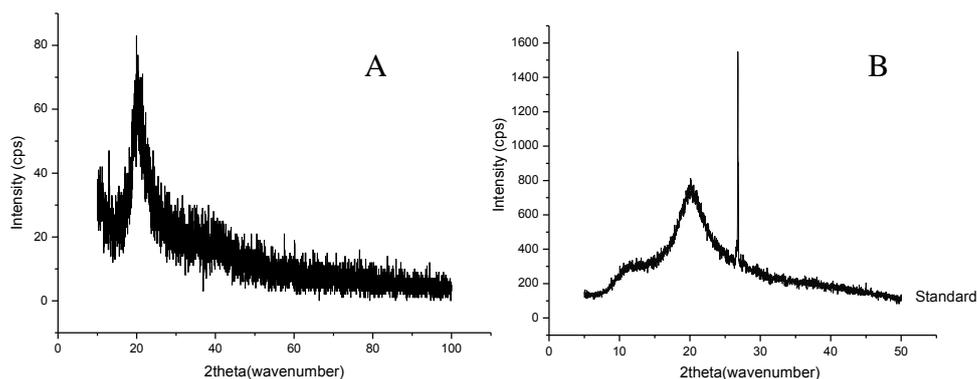


Figura 4. Difratoograma de Raios-X de quitosana. (A) Quitosana microbiológica de *C. elegans* na melhor condição do planejamento fatorial completo. (B) Difratoograma de Raios-X quitosana comercial

3. Seção Experimental

3.1. Micro-organismo e manutenção

Foi utilizada a linhagem de *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 da Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais–NPCIAMB/UNICAP, registrada no World Federation for Culture Collection (WFCC). A cultura foi mantida no meio PDA (Batata-Dextrose-Agar) mantido à temperatura de 5°C.

3.2 Produção de biomassa por *C. elegans*

O inóculo foi realizado transferindo-se esporângios de *C. elegans* para frascos de Erlenmeyer contendo 100mL de água destilada estéril para obtenção de uma suspensão de 10^7 células/mL e em seguida, alíquotas de 1mL foram transferidas para placas de Petri (9 cm/diâmetro) contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) incubadas por 24 horas a 28°C. Posteriormente, 20 discos (30x6mm) foram transferidos para o meio de produção conforme concentrações estabelecidas pelo planejamento fatorial de 2^3 em frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio de cultivo constituído por milhocina, asparagina e sacarose (Tabela 2). O cultivo foi realizado sob agitação orbital de 150 rpm, a 28°C, durante 96 horas. Ao final do cultivo, a massa micelial de *C. elegans* foi filtrada a vácuo, lavada com água destilada estéril gelada e em seguida congelada e liofilizada. Para a detemção do peso constante da biomassa foi mantida em dessecador a vácuo e a pesagem feita por gravimetria expressa em g/L.

Tabela 2- Matriz do planejamento de 2³ para a produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella elegans*.

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	+1
Asparagina% (p/v)	0,00	0,025	0,05
Sacarose% (p/v)	0,1	0,15	0,2
Milhocina% (v/v)	0,3	0,45	0,6

3.3 Extração da quitosana

A extração do biopolímero quitosana foi realizada por meio de tratamento álcali/ácido que consiste na desproteinização da biomassa liofilizada com a adição de uma solução de hidróxido de sódio (1M/30mL/g 121°C por 15min), e em seguida, a separação da fração álcali-insolúvel (AIF) após centrifugação (4000rpm/15min) por filtração a vácuo. Após a separação da fração AIF foi feita a lavagem do material filtrado em etapas alternadas com soro fisiológico (0,85%) e água destilada gelada até pH 7. O resíduo obtido, após esta etapa, foi submetido ao tratamento com ácido acético (2% 30 mL/v/g 100°C por 15min) em seguida centrifugado(4000rpm/15min) e filtrado. O resíduo foi lavado com água destilada gelada e centrifugado (4000rpm) até pH 7,0, para obtenção da quitina. Em seguida levada a estufa de secagem (30°C/48h). O sobrenadante foi alcalinizado até pH 9,0, mantido em refrigerador por 24 horas para precipitação e concentração da quitosana. A quitosana obtida por centrifugação (4000rpm/15min), foi lavada com água destilada gelada e soro fisiológico até pH 7,0. Em seguida, a quitosana foi seca em estufa com temperatura de 30°C, por 24-48 horas [32,33]. O teor de quitosana foi expresso em g/L.

3.3 Determinação do carbono e nitrogênio total

No meio de cultivo do planejamento experimental, com maior produção de biomassa e quitosana, foram realizadas análises químicas quanto aos teores de carbono orgânico e nitrogênio total consumido por *C. elegans* e o remanescente no meio de cultivo. O percentual do carbono foi avaliado pelo método volumétrico do bicromato de potássio e titulação pelo sulfato ferroso. Este método consiste na oxidação do carbono orgânico contido em um determinado volume de amostra, com solução 0,1 N de dicromato de potássio em meio ácido, seguida de titulação do excesso de dicromato com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,05 N, utilizando-se solução de ferroína como indicador [34].

Para determinação do nitrogênio total foi usado o método de Kjeldahl que compreende duas etapas: (1) digestão da amostra para converter N_{org.} a íon amônio (N-NH₄⁺) e (2)

determinação do N-NH_4^+ no digerido, após destilação com álcali. O sulfato de amônio resultante da digestão é aquecido com uma base, desprendendo amônia (NH_3), e a reação pode ser representada pela equação: $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$. A amônia é então recolhida em uma solução ácida, e a espécie N-NH_4^+ determinada por colorimetria, eletrodo íon seletivo ou titulação com solução padrão ácida [35, 36].

3.4 Determinação do pH

Após o cultivo, o líquido metabólico livre de células foi submetido à determinação do pH por potenciometria. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.5 Caracterização físico-química da quitosana

Espectroscopia ao raio infravermelho – IR: Foram utilizados dois miligramas (2mg) de quitosana previamente seca a 60°C sob pressão reduzida. Em seguida foram completamente homogeneizadas com 100mg de brometo de potássio (KBr). Os discos de brometo de potássio preparados foram secos durante 24 h a 110°C , sob pressão. Os espectros ao raio infravermelho foram realizados utilizando-se espectrotômetro com transformada de Fourier (FTIR), BRUKER Mod. IFS. Discos de brometo de potássio foram utilizados como referência. A intensidade das faixas de absorção máxima foi determinada pelo método de linha base. O grau de desacetilação (DA%) foi determinado de acordo com a metodologia descrita, aplicando a seguinte equação [15]:

$$[\text{DD}\% = (\text{A}_{1655}/\text{A}_{3450}) \cdot 100/1] \quad (1)$$

Índice de cristalinidade: O difratograma de raios X da quitosana foi obtido no Laboratório de Raio-X do Departamento de Física da UFPE. A medida foi realizada usando o equipamento raios-X modelo SIEMENS D 5000, radiação $\text{Cu K}\alpha$ sendo $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$, em uma faixa de varredura entre 4° e 50° com taxa de $0,02 \text{ min}^{-1}$. A distância interplanar foi determinada pela largura da meia altura do pico de maior intensidade (I_C). O índice de cristalinidade (I_{CR}) foi determinado com o emprego da equação:

$$[\% = I_{CR} (I_C - I_A / I_C) \times 100] \quad (2)$$

sendo: I_C e I_A as intensidades dos sinais das regiões cristalinas ($2\theta=20^\circ$) e amorfas ($2\theta=12^\circ$).

3.6 Planejamento fatorial

A validação da produção do biopolímero quitosana e a verificação da influência das fontes de carbono e de nitrogênio, no crescimento micelial de *C. elegans*, foram realizadas por meio de Diagramas de Pareto. Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos a análises estatísticas por meio do Programa STATISTIC versão 7.0 da StatSoft Inc., USA. Foi realizado um planejamento fatorial completo de 2^3 para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações asparagina, milhocina e sacarose sobre a variável resposta produção de biomassa e quitosana, utilizado o software STATISTICA versão 7.0 da StatSoft®.

4. Conclusões

A produção de biomassa e quitosana por *C. elegans* através de processo fermentativo, possibilitou nas condições aqui estudadas, a identificação das principais interações e dos efeitos que foram produzidos pelas fontes de carbono e nitrogênio presentes na formulação do meio de cultivo de baixo custo. A milhocina demonstrou ser a única variável independente que influencia significativamente o aumento simultâneo das concentrações de carbono e nitrogênio no meio estudado, possivelmente, devido à presença de vários aminoácidos essenciais sua composição. Neste sentido, o bioproduto formado na proporção de 2:6 de Carbono:Nitrogênio do meio (sacarose, asparagina, milhocina), na melhor condição apresenta elevada produção, bem como características físico-químicas importantes para assegurar a condição de um biopolímero promissor para várias aplicações.

Agradecimentos

Este trabalho teve suporte financeiro da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Os autores agradecem ao Centro de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, pela utilização dos seus laboratórios.

5. Referências Bibliográficas

1. Campana-Filho, S.P.; Britto, D.; Curti, E.; Abreu, F.R.; Cardoso, M.B.; Battisti, M.V.; Sim, P.C.; Goy, R.C.; Signini, R.; Lavall, R.L. Extração, estruturas e propriedades de alfa e beta-quitina. *Quím. Nova.* **2007**, *30*, 644-650.
2. Kleekayai, T.; Suntornsuk, W. Production and characterization of chitosan obtained from *R. oryzae* grown on potato chip processing waste. *W. J. Microbiol. and Biotechnol.* **2011**, *27*, 1145-1154.
3. Sun, L.; Huang, H.H.; Liu, L.; Zhong, D.F. Transformation of Verapamil by *Cunninghamella blakesleana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, *5*, 2722-2727.
4. Amadio, J.; Murphy, C. D. Biotransformation of fluorobiphenyl by *Cunninghamella elegans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 345-351.
5. Bernat, P.; Dlugonski, J. Degradation of tributyltin by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*, with involvement of cytochrome P-450. *Biotechnol. Letters*, **2002**, *24*, 1971-1974.
6. Bernat, P.; Rafal, S.; Mariusz, K.; Jerzy, D. Butyrtins degradation by *C. elegans* and *Cochliobolus lunatus* co-culture. *J. Hazard Mater.* **2013**, *15*; 246-247.
7. Lima, R.A.; Andrade, R.F.S.; Santos, L.Q.; Campos-Takaki, G.M; Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado de petróleo. *Exacta.* **2010**, *8*, 201-210.
8. Lima e Silva, T.A.; Luna, J.M.; Moraes Filho, M.A.; Campos-Takaki, G.M. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. *Exacta.* **2010**, *8*, 19-26.
9. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.; Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *J. Surfact. Deterg.* **1999**, *2*:237-242.
10. Amorim, S. R. V.; Pedrosa, R. P.; Fukushima, K.; Martínez, C. R.; Ledingham, W. M.; Campos-Takaki, G. M. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. *Food Technol. Biotechnol.*, **2006**, *44*, 519- 534.

11. Freitas, S.M.C.; Stamford, T.C.M.; Franco, L.O.; Campos-Takaki, G.M. Effect of salinity and glucose on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans*. *Asian Chitin J.* **2006**, *2*, 29-38.
12. Stamford, T. C. M. *et al.* Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, *10*, 61-68.
13. Cardoso, A.; Marques, S.A.; Marinho, P.H.C.; Shiosaki, R.K.; Campos-Takaki, G.M. Influence of the heavy metal on chitosan production by *Absidia corymbifera* UCP 0134. In: *Microorganisms in Industry and Environment*, Mendez-Vilas A (ed) : Lisbon, 2010, pp. 176-180.
14. Silva, T. A.; Tambourgi, E. B.; Campos Takaki, G. M. Inorganic polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans* (UCP 542) and its influence in the decolorization of textile azo dye Orange II. *Clean. Technol. Environ. Polic.*, **2013**, v.1-6.
15. Roberts, G.A.F. *Chitin chemistry*. London: MacMillan Press. 1992.
16. Jaworska, M.M.; Konieczna, E. The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *56*, 220-224
17. Cardoso, A. Chitin and chitosan: versatile polysaccharides produced by *Rhizopus arrhizus*. *Asian Chitin J.* **2008**, *4*, 1-8.
18. Obayori O.S; Adebusoye, S.A.; Ilori, M.O.; Oyetibo, G.O.; Omotayo, A.E; Amund, O.O. Effects of corn steep liquor on growth rate and pyrene degradation by *Pseudomonas* strains. *Curr Microbiol.* **2010**, *60*, 407-411.
19. Batista, A.C.L.; Cardoso, A.; Santos, E.; Freitas, S.M.C.; Alves, S.C.A.; Campos-Takaki, G.M Influence of simultaneous factors on chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* (UCP/WFCC 0148) in corn steep liquor culture media. *Asian Chitin J.* **2011**, *7*, 63-67.
20. Cardoso, A.; Lins, C.I.; Santos, E.R.; Freitas, S.M.C.; Campos-Takaki, G.M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules.* **2012**, *27* 4904-4914.
21. Merzendorfer, H. Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **2006**, *176*(1), 1-15.

22. Chaves, J.A.P.; Bezerra, C.W.B.; Silva, H.A.S.; Santana, S.A.A.. Caracterização e aplicação do biopolímero quitosana como removedor de corante têxtil presente em meio aquoso. *Cadernos de Pesquisas*. **2009**, *16*, 36-43.
23. Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N.A.A.Q. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Scienc. Nutr.*, **2003**, *43*, 145-171.
24. Campos-Takaki, G.M. The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In Dutta PK (Org.). *Chitin and chitosan opportunities and challenges*. India. 2005
25. Park, J.P.; Kim, S.W.; Hwang, H.J.; Yun, J.W. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exobiopolymer production by *Cordyceps militares*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, *33*: 76-84.
26. Jaworska, M.; Sakurai K, Gaudon, P. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. *Polymers Internat.* **2003**, *52*, 198-205.
27. Guerra-Sánchez, M.G.; Vega-Pérez, J.; Velázquez-Del, Valle M.G.; Hernández-Lauzardo, N.A. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* by effect of chitosan with different molecular weights. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2009**, *93*, 18-22.
28. Imai, T.; Watanabe, T.; Yui, T.; Sugiyama, J. The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. *Journal. Biochem.* **2003**, *374*, 755-760.
29. Kafetzopoulos, D.; Aggeliki Martinou, A.; Bouriotis, V. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc.Natl. Acad. Sci.*, **1993**, *90*, 2564-2568.
30. Bento, R. A.; Stamford, T. L.; Campos-Takaki, G. M.; Stamford, T.; Souza, E. L. D. Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. *Brazilian. Journal. Microbiology.*, **2009**, *40*, 583-589.
31. Streit, F.; Koch, F.; Laranjeira, M.; Ninow, J. L. (Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, *40*(1), 20-25.
32. Silva, A.M. Produção de Quitosana por *Absidia corymbifera* em Meio de Baixo Custo e Aplicação na Descoloração de Efluente Industrial. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Pernambuco, 2010.
33. Ninow, J. L. Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazil. J. Microbiol.*, **2009**, *40*, 20-25.

34. Hu, K.J.; Hu, J.L.; Ho, K.P. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydr. Polymers*. **2004**, *58*, 45-56
35. Baumgarten, M. G. Z.; Rocha, J. M. B.; Niencheski, L. F. H. Manual de análises em oceanografia química. Rio Grande: Editora da FURG, 1996. 132p.
36. Yasuhara, T.; Nokihara, K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4581-4583.

Sample Availability: Samples of the compounds biomass and chitosan are available from the authors. © 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

CAPÍTULO 3

Artigo submetido à revista JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS

**Kinetic model in batch system for removal of hexavalent chromium by
Cunninghamella elegans UCP / WFCC 0542**

E. R. Santos¹, R. A. Lima¹, M. A. C. Luna², N. Lima³, T. Tavares³, E. S. Santos⁴, A.
Elesbão⁵, K. Okada⁵, G. M. Campos-Takaki⁵ *

1 Doctorate of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, PE Brazil; (ERS) santosmestrado@gmail.com;

2 MSc Environmental Process Development - Catholic University of Pernambuco, Boa Vista 50050-590 Recife, PE, Brazil.

3 University of Minho, Department of molecular biology and celular.Braga, / Portugal.

4 Federal University of Rio Grande do Norte Campus Lagoa Nova, 59078-900, Natal – RN, Brasil; (ESS) everaldo@eq.ufrn.br;

5 Catholic University of Pernambuco, Boa Vista 50050-590 Recife, PE, Brazil. (ACS) antoniocardoso2000@yahoo.com.br; (SCP) sergio@unicap.br; (KO) kao@unicap.br; (GMCT) galba_takaki @ yahoo.com.br

* Author to whom correspondence should be addressed, E-Mail: galba_takaki@yahoo.com.br
Tel: +55-81-21194044, Fax: +55-81-21194043.

Abstract

Chromium and its compounds are toxic metals introduced into natural water from a variety of industrial wastes. The major sources are from leather tanning, textile dyeing, electroplating, and metal finishing industries, which cause severe environmental and public health problems. The adsorption process is one of the most efficient methods to remove chromium of from waste water. The aim of this study was the evaluation of *Cunninghamella elegans* 0542 biomass as biosorbent for Cr (VI) in aqueous solutions. The *C. elegans* biomass was produced using sucrose and corn steep liquor, asparagine as carbon sources and nitrogen. The residual

chromium was determined by using 1,5-diphenyl carbohydrazide in plasma atomic absorption spectroscopy (AAS). The results of the kinetic biosorption 96 hours corresponded to the concentration of chromium used with removal of 97.2, 90, 72,04, 41,74, 36,39, 22, and 16%, respectively for concentrations of 5, 10, 25, 50, 75 and 100 mg/L, showing a removal efficiency at low concentrations. It was also found that the maximum absorption corresponds to 9.1 mg/g of biomass was obtained in solution containing 100 mg/L of chromium. The analysis of the kinetic data show that biosorption of chromium followed the kinetics model pseudo-second order.

Key words: *Cunninghamella elegans*, biomass, biosorption, chromium (VI)

1. Introduction

Heavy metals are considered the most pollutant agents and part of its liberation in environment is related to human industrial activities. The increase in the metallic ions concentration is causing serious ecological problems in many parts of the world [1,2,3,4,].

The industrial residues containing heavy metals can cause damages to the environment and to the health human being [5]. Chromium (Cr) is considered an essential metal, but in high concentrations can be harmful to the live systems, including, human being [6]. Chromium enters the air, water, and soil mostly in the chromium (III) and chromium (VI) forms. Chromium, in its myriad chemical forms and oxidation states, has been well studied in terms of its general chemistry and its interactions with biological molecules. Chromium (VI) and its compounds are classified as carcinogens [7]. In Brasil, the resolution 357/2005 of the National Environmental Council –CONAMA [8] establishes the maximum concentration of this metal in aquatic environments.

Chrome is the primary threat when ever tanning industry comes in to practice. Though many treatment options were evaluated to prevent its consequence on the environment, neither of them could achieve to treat or recover chrome 100%. Treatment options are either; inefficient, complicated, energy demanding, costly or applicable to a certain parts of the world due to technology or skilled man power demand.

Adsorption is integral to a broad spectrum of physical, biological, and chemical processes and operations in the environmental field. The adsorption is an alternative method of

treatment used for the toxic metal removal of industrial effluents. In this process, adsorbent is the substance on the surface of which adsorption takes place, and adsorbate is the substance which is being adsorbed on the surface of adsorbent [9]. The application of this technique has been considered superior to others techniques for the waters reuses of effluents in terms of initial cost, flexibility, and operational facilities. However, the process efficiency is related to the adsorbent properties, such as high capacity, high selectivity, low cost, long life, fast kinetics and disponibility [10].

The search for alternative and innovative treatment techniques has focuses attention on the use of biological materials such as algae, fungi, yeast and bacteria as sorbents for removal and recovery technologies because of the better performance and low-cost [11,12]. This process is called biosorption and is based on the ability of ions removal in aqueous solutions, being therefore, considered a promising method for the treatment of for metal-bearing industrial wastewaters [13,14].

The biosorption depends on the electrostatic interaction and formation of metallic complexes between ions and functional groups in the biomasses surface, when these possess chemical affinity for the metal. Also, chemical modifications on biosorbent surface can be performed for the introduction of functional groups in the structure of these adsorventes, which can increase the capacity of adsorption for heavy metals [15,4]. Fungal biomass has certain advantage over bacterial biomass in this natural 'ecofriendly green technological process' in respect of processing and handling of the biomass [16,2,3].

The objective of this work was to investigate the potential of *Cunninghamella elegans* biomass as a cost-effective biosorbent for Cr (VI) sorption in waste water solution, aiming at its future application in the treatment of tannery effluent industry

2. Materials and Methods

2.1 Micro-organism

The micro-organism used in this study of chromium removal was *Cunninghamella elegans* UCP 542, isolated from mangrove sediment of Formoso River, located at Formoso River -PE, Brazil. The isolate is maintaining in the Culture Bank of Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Recife, Brazil, registered in the WFCC (World Federation Culture Collection). The microorganism is maintaining in Potato Dextrose Agar (PDA) at 5° C.

2.2 Biomass production

The microorganism *C. elegans* was grown on plates of PDA (on PDA (Potato Dextrose Agar) for 24 hours at 28 ° C, as pre-inoculum. then transferred to Erlenmeyer flasks containing 200 ml of culture medium consisting of defined composition of asparagine 0.025 %, 0.15% sucrose, and supplemented with 0.45% of corn steep liquor and incubated at 28 ° C for 96 hours under orbital agitation of 150 rpm. Biomass was harvested from the fermented medium by centrifugation at 10,000rpm for 10 min at 40 °C and washed with deionized water. Biomass was then dried by lyophilization.

2.3 Chromium Solution

Standard stock solution of Cr(VI) was prepared with $K_2Cr_2O_7$ salt from Merck, according to APHA Standard Methods [17], and was used to make solutions in concentration of 5mg/L, 10mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 75mg/L and 100mg/L.

2.4 Batch kinetic studies

Assays for testing the adsorption of chromium (VI) with biomass *C. elegans* were performed by adding 0.6 g of biomass *C. elegans* solutions to 150mL of Chromium VI in the following concentrations: 5, 10, 25, 50, 75 and 100 mg / L. The flasks were kept under orbital agitation of 150 rpm at 28 ° C for 96 hours, and monitored for adsorption as a function of pH, time and isotherms. After filtration process aliquots of the solutions were taken at regular time intervals (0-96h) for the determination of Cr (VI) and subsequent analysis as residual capacity and removal efficiency biosorption of chromium. The amount of adsorption at equilibrium (q_e mg/g) and sorption efficiency (%) were calculated according to the expressions:

$$q \text{ (mg/g)} = V (C_i - C_f) / m \quad (1)$$

$$R \text{ (%) } = (C_i - C_f) \times 100 / C_i \quad (2)$$

Where C_i and C_f are the initial and equilibrium concentrations (mg/L), V the volume of solution (L), m is the biomass g.

q is the removal of chromium capacidade mg/g biomass

R is the adsorption efficiency for biomass

2.5 Biosorption kinetic model

Several models can be used to express the mechanism of solute sorption onto a sorbent. In order to investigate the controlling mechanism of adsorption processes, pseudo-second-order equation, are applied to model the kinetics of Cr(VI) adsorption onto the adsorption (Equation 3). The adsorption rate constant (k_2), the coefficient of correlation (R^2) and the chromium adsorbed (q_e) were uses for the model kinetic studies. The adsorption mechanism of second order was expressed as:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

By using the equation 3 was determined the equation 4

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e} + \frac{k_2 t}{(q_e^2 k_2)} \quad (\text{Eq. 4})$$

The equation 4 was reordered for linear form

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e^2 k_2} + \frac{t}{q_e} \quad (\text{Eq. 5})$$

2.6. Chromium assay

Hexavalent chromium was determined colorimetrically Cr(VI) concentration was determined using a UV-visible spectrophotometer colorimetrically with the 1,5-diphenylcarbazide method. Diphenylcarbazide reacts with Cr(VI) in mineral acid media and a Cr(III)-diphenylcarbazone complex occurs[18]. The DPC reagent was prepared by adding 24 mL of 85% H_3PO_4 to 56 mL distilled water. This solution was mixed with 0.076 g DPC previously dissolved in 20 mL of 95% ethanol. The reagent was stored in dark at 4°C. Cr(VI) in the sample was assayed by adding 125 mL of the DPC reagent to 1 mL of chromium samples, mixed gently and kept at room temperature for 20 min. The concentrations of Cr(VI)

in the solutions derived from all runs were measured spectrophotometrically (Perkin-Elmer model 550S UV-Vis Spectrophotometer) using 1,5-diphenyl carbazide in an acid medium. Absorbance was measured at the wavelength $\lambda = 540$ nm [17]. Cr(VI) concentration in the sample was calculated from a standard curve using $K_2Cr_2O_7$ as standard.

2.7 Scanning electron microscopy analysis of C. elegans biomass

Samples were washed twice in PBS, pH 7.2, for 10 minutes. Then they were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, for 1 hour at room temperature. After the stage-setting, all samples were again washed twice with phosphate buffer, for 10 minutes. This procedure was followed by the post-fixing with osmium tetroxide 1% in phosphate buffer, for 1 hour at room temperature, in absence of light. Then the samples were once again washed with 0.1 M phosphate buffer, and submitted to the process of dehydration. The dehydration of the samples was done with ethanol, in concentrations of 50%, 70%, 90% (5 minutes for each exchange) until the proportion of 100% (three times, 10 minutes each exchange). After this step, the samples were submitted to the critical point, followed by the assembly in support of aluminum and subsequent gold metallization. Once prepared, samples were examined and photographed in the Scanning Electron Microscope, JEOL LV 5600, operating at 20KV.

3. Results and discussion

3.1 Chromium VI biosorption by C. elegans biomass

Worldwide chromium contamination of soils has arisen predominantly from the common practice of land-based disposal of tannery wastes under the assumption that the dominant species in the tannery waste would be the thermodynamically stable Cr (III) species[3].

Studies on the development of effluent treatments containing heavy metals have indicated that adsorption is a highly effective and inexpensive alternative process among the various treatments available. The sorption of pollutants from aqueous solution plays an important role in wastewater treatment since it eliminates the need for huge sludge-handling processes. Well-designed sorption processes have high efficiency resulting in a high-quality effluent after

treatment which can be recycled. Furthermore, if low-cost sorbents or sorbent regeneration is feasible then the sorbent material cost can be kept low [19].

In this study, the biomass *C. elegans* produced in culture medium containing low cost alternative corn steep liquor was used to adsorb chromium in order to determine the efficiency as an alternative method for treatment of wastewater containing toxic metals such.

The analysis of the removal of Cr (VI) by *C. elegans* depending on the initial concentration of metal ions is shown in Figure 1. The results of the kinetic biosorption 96 hours corresponded concentrations the chromium used is found an efficiency of 97.2 biosorption, 90, 72,04, 41,74, 36,39, 22, and 16% respectively for concentrations of 5, 10, 25, 50, 75 and 100 mg / L, which shows a higher efficiency removal in low concentrations.

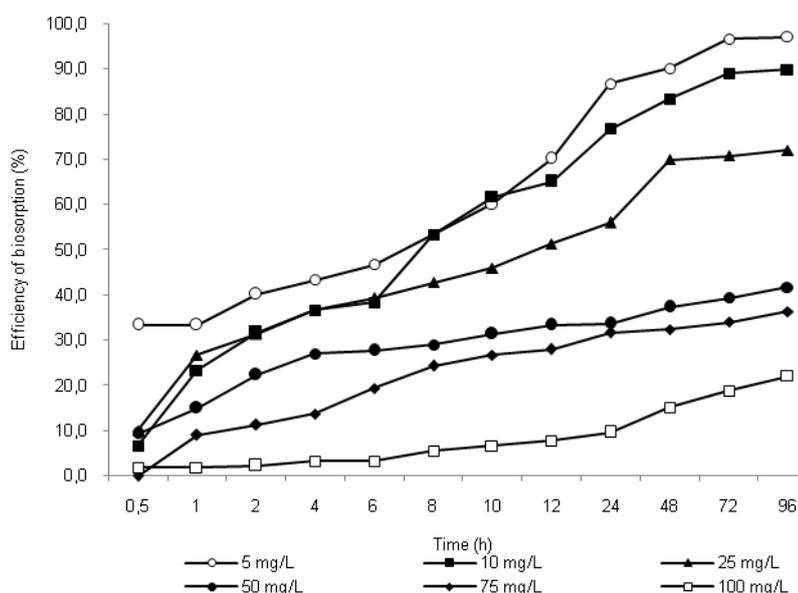


Figure 1. Chromium VI efficiency of biosorption by *Cunninghamella elegans* as time function and chromium concentration with 0.6 g of biomass, 28°C for 96h.

The data on the effectiveness of bioremediation of Cr (VI) demonstrate that the concentrations used the time and concentrations were determining the behavior of the metal removal process.

The results for the adsorption capacity of the biomass *C. elegans* (mg/g of biomass) of Cr (VI) by biomass *C. elegans* showed an increased with the concentration of the chromium used. We observed maximum adsorption capacity of 1.22, 2.25, 4.5, 5.22, 4.16 and 9.1 mg/g biomass respectively for concentrations of 5, 10, 25, 50, 75 and 100 mg/L, after 96 hours in Figure 2.

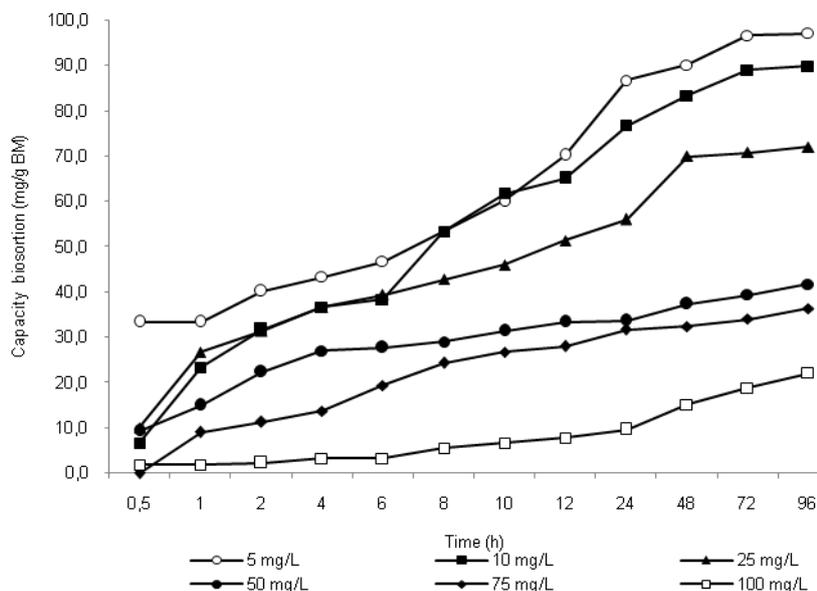


Figure 2. Chromium VI capacities of biosorption by *Cunninghamella elegans* as time function and chromium concentration with 0.6 g of biomass, 28°C for 96h.

The results obtained for the relationship between biosorption capacity and efficiency may be due to the increase in the number of ions competing for the available binding sites in the biomass. At lower concentrations, all metal ions present in the solution would interact with the binding sites and thus facilitated the process of adsorption. The number of ions adsorbed from higher concentrations is more than that removed from less concentrated solutions.

Similar results were obtained by [20]. The authors revealed that uptake capacity was increased with increase in concentration of Cr(VI) ions from 10 to 60 mg/L. Uptake rate of Cr(VI) increased from 1.72 to 2.39 mg/g with *Aspergillus niger*, 1.22 to 1.76 mg/g with *Aspergillus sydoni* and 1.18 to 1.77 mg/g with *Penicillium janthinellum*.

As higher ions concentration enhanced the mass transfer driving force, and increased the metal ions sorbed per unit weight of adsorbent at equilibrium [21] In addition, increasing metal ions concentration increased the number of collisions between metal ions and sorbent, which enhanced the sorption process [22,23,21]. The decrease in Cr (VI) levels occurred at a different rate.

For *Neurospora crassa* as the initial concentration of Cr(VI) increased from 25 to 250 mg/L loading capacity was also increased from 1.0 to 9.15 mg/g [24].

Several data in literature reveal the use of fungal biomass as a potential hexavalent chromium biosorbent in aqueous solutions and tannery effluent. *Aspergillus niger*, *Rhizopus*

oryzae, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum* and *Trichoderma harzianum* were tested for Cr (VI) adsorption [26]. All of these dead fungal biomass completely removed Cr(VI) from aqueous solutions, that of *R. oryzae* being the most effective. Cr(VI) was removed from aqueous solutions by the reduction to Cr(III) when it contacted with the biomass.

Sen et al [27] isolate fungus from soil and used for the removal of Cr(VI) from aqueous solution using biological sources as biosorbent has assumed advantageous over the existing conventional physico-chemical techniques for the treatment of metal contaminated wastes.

Venkateswarlu et al. [28], using 25 initial concentrations of 25 mg/L a 125 mg/L of chromium, verified that with increased it of the concentration has a reduction of the percentage of removal observing that the adsorption decrease of 94,6 to 78,6%.

Sharna e Adholeya [29] studies the recovery potential of Cr(VI) and Cr(III) by *Paecilomyces lilacinus*. The authors revealed that the specie was able to remove 1,24 mg L⁻¹ of chromium VI and 7,91 mg L⁻¹ of chromium III.

Since metal biosorption from solution was predominantly due to physico/chemical interactions between the biomass and metal in solution, morphological differences existing within biomass can greatly influence the biosorption process. The cellular structure of *Cunninghamella elegans* mainly contains chitin and chitosan polymers which can make significant difference in metal uptake by this species. Thus this fungal species can be a good source of cost effective biosorbent through biotechnological development for removal of Cr(VI) from industrial effluents in a potential manner.

Though there was not much reports was available on the role of *Cunninghamella elegans* with biosorption capability, the present study had indicated that this fungal strain can also be used as a material for effective removal of heavy metal from aqueous solutions.

3.3 Kinetic Model of pseudo-second order

Data obtained from adsorption parameters were adjusted by the kinetic pseudo-second order model. The results obtained from the application of the model based on equation 4 are presented in figure 3. A high significance of linear relationship for chromium biosorbed (t/qt) in function of time (t) is presented.

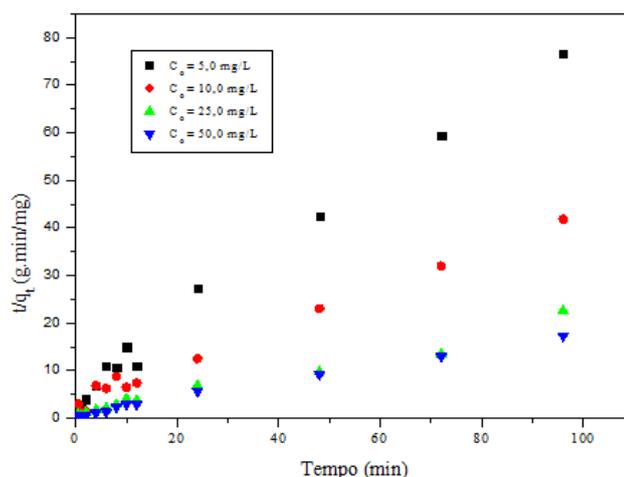


Figura 1. Kinetic pseudo-second order model for chromium biosorption by *Cunninghamella elegans*. Parameters used: solution volume: 150 mL; initial concentration: 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 mg/L; Biomass: 0,6 g; Temperature: 28 °C.

The parameters investigated by the model, q_{eq} , k_2 and R^2 experimental and calculated values are shown in Table 1. The values of velocity constant were calculated for the model. The highest chromium sorption (q_2) resulted from an increase in the metal concentration in solution. The highest values of adsorption by the biomass were found for the highest metal concentrations. Data also revealed a high correlation (R^2) for all experimental conditions evaluated.

The straight-line plots of t/q_t versus k_2 , as shown in Fig. 2, have been used to obtain the rate parameters. The calculated values of k_2 and q_e , along with the correlation coefficient (R^2) values, are presented in Table 1. The results show that the second-order rate constant k_2 decreased with an increase in initial Cr(VI) concentration. It may also be found from Table 2 that the calculated q_e values agreed well with those of experimentally obtained q_e for the pseudo-second-order model. Also, the correlation coefficient values for all Cr(VI) concentrations obtained by fitting the experimental data to Eq. (3) were close to 1.0.

Tabela 1 – Parameters of kinetic pseudo-second order for Cr (VI) biosorption by *Cunninghamella elegans* biomass

Concentração inicial de Cromo (mg/L)	q_e (mg/g)	k_2 (g.min/mg)	R^2
5,0	1,291	0,150	0,995
10,0	2,457	0,057	0,994
25,0	4,858	0,047	0,988
50,0	5,694	0,051	0,997

Studies of sorption kinetics in wastewater treatment are significant as it provides valuable insights into the reaction pathways and into the mechanism of sorption reactions. In addition, the kinetics describes the solute uptake rate which in turn controls the residence time of sorbate uptake at the solid–solution interface. Therefore, it is important to be able to predict the rate at which pollutant is removed from aqueous solutions in order to design appropriate sorption treatment plants.

Adsorption isotherms describe the partitioning of a chemical species between adsorbed and dissolved phases. Adsorption from solution is an important process in natural systems, and has also been exploited for use in analytical chemistry and engineering processes. It finds applications in electro-analytical chemistry, ion-exchange, froth flotation, coagulation and collection of trace contaminants. Adsorption reactions are common processes in water and waste water treatment and in the transport of chemical species in the environments [2] The production of low cost adsorbents for the clean-up of contaminated waters is of considerable importance for the improvement of environmental quality in developing countries [3]

To choose the mathematical model that can be best adjusted to fit the experimental data and appropriately describe the adsorption system, the following conditions should be met: the highest (near-unity) r and lowest RMSE (root-mean-square error) values [30].

Adsorption kinetics showed strong dependence on the physical and/or chemical characteristics of the adsorbent material, to a certain extent, which also influenced the adsorption mechanism. Numerous kinetic models have described the reaction orders of adsorption systems based on the solution concentration and based on the capacity of the adsorbent [31,30].

The pseudo-second-order model, considers the rate-limiting step as chemisorption involving valency forces through sharing or exchange of electrons between adsorbate and adsorbent, and provide the best correlation of the data [32,31].

In this work the study of adsorption kinetics was significant, as it provided valuable insight into the reaction pathways and into the mechanism of the reaction. The kinetic parameters give important information for design and modeling of the adsorption operation. Thus, it may be concluded that the adsorption of Cr(VI) on *C. elegans* biomass followed the pseudo-second-order kinetic model.

Similar data has been observed in Cr(VI) adsorption by used coir pith [33], *Leersia hexandra* Swartz biomass [34], and ethylenediamine-modified rice hull [34].

3.5 Scanning electron microscopy study

The scanning electron microscopy of *C. elegans* biomass was carried out to identify the effects induced by the chromium(VI) exposure in concentrations of 10 and 100mg/L. The results had demonstrated that the control *C. elegans* biomass (Figure 4 A), presented flattened and wide hyphae in a ribbon form, with homogeneous and smooth surface, of high eletrondensity and several reproduction structures. The exposition to Chromium VI 10 mg/L, induced reduction in the number of reproductive structures, intense mycelial compactation, hyphae with irregular, wrinkled and heterogeneous surface, reduction of eletrondensity and presence of electrondense deposits in the external face of the cellular walls (Figure 4B). Cells of *C. elegans* exposed to 100mg/L of Chromium VI, presented a high eletrondensity, and mycelia density (Figure 4C). Such behavior, probably, corresponds to the metal deposition in the surface of the cellular walls, inducing the compacting of the micélio.

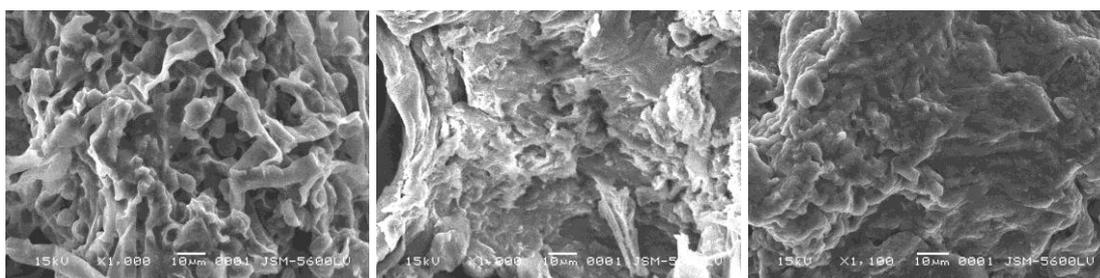


Figura 4A

Figura 4B

Figura 4C

Figura 2. Electronmicrographs of *Cunninghamella elegans* biomass. (A) Control sample, (B) biomass exposed to chromium 10mg/L, (C) biomass treated with 100mg/L of chromium.

Some data in the literature reveals that heavy metals can influence the biochemical, physiological and morphological aspects of microorganisms, inducing variations in the germination patterns, enzyme activity, pigment production and cellular growth [36].

Morphological alterations are cited in fungi, bacteria, algae, also in animals and plants. Thus, some common responses, are refered as bioindicators and are related to the environmental monitoring [36].

The alterations cited, observed by light and electronic microscopy, are related to heavy metal concentrations, contact time, cellular age, and properties of the strain or specie [2,16].

4. Conclusions

The biomass of *Cunninghamella elegans* could be used as a efficient biosorbent for chromium VI biosorption. Efficiencies of 97,2, 90, 72,04, 41,74, 36,39 and 22,16%, were obtained for Cr(VI) at 5mg/L, 10mg/L, 25mg/L, 50mg/L, 75mg/L and 100mg/L. The result of batch adsorption clarifies the percentage of removal of metal ions from their wastewater solution. Kinetic studies showed that the adsorption adhered to the pseudosecond-order model since theoretical and experimental sorption capacities were in excellent agreement and R^2 corresponded to 0.995, 0.9994, 0.988 and 0.997 for 5.0mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L and 50mg/L, respectively.

Acknowledgements

This work was supported by the CNPq Agency. The authors are most grateful to Catholic University of Pernambuco and the Research Nucleus of Environmental Sciences.

5. References

- [1] R. F. Rodrigues; R. L. Trevezoli; L. R. G. Santos; V. A. Leão; V. R. Botaro. Heavy metals sorption on treated wood sawdust. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 21–26, 2006
- [2] G. M. Gadd. E. P. Burford; M. Fomina; K. Melville. Mineral transformation and biogeochemical cycles: a geomycological perspective. In *Fungi in the Environment*, (2007). pp. 78–111.
- [3] G. M. Gadd,. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* v. 156 (3), (2010), p. 609-643,
- [4] V. C. G. Santos; J. V. T. M. Souza; C. R. T. Tarley; J. Caetano; D. C. Dragunski. Copper ions adsorption from aqueous medium using the biosorbent sugarcane bagasse in natura and chemically modified. *Water, Air, and Soil Pollution*, Dordrecht, v. 216, n. 1/4, p. 351-359, 2011.
- [5] A.P.G. YAMAMURA; M. YAMAURA . Estudo da cinética e das isothermas de adsorção de U pelo bagaço de cana-de-açúcar. In: International Nuclear Atlantic Conference - INAC2005, 2005
- [6] C. Pellerin; S.M. Booker. Reflections on hexavalent chromium. *Environ Health Persp* 108, (2000), 402–407
- [7] V.C.T. Costodes; H. Fauduet ; C. Porte ; A. Delacroix. Removal of Cd(II) and Pb(II) ions, from aqueous solutions, by adsorption onto sawdust of *Pinus sylvestris*. *Jornal of Hazardous Materials*, 105, (2003) 121-142.
- [8] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/index.cfm>>. Acesso em: 01 de fev. de 2013.
- [9] K. K. P. Porpino. Bioadsorção de ferro (II) por casca de caranguejo *Ucides Cordatus*. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.
- [10] A. P. S. Immich; Remoção de corantes de efluentes testeis utilizando folhas de *Azadirachta indica* como adsorvente. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. 119p (dissertação de mestrado) NOURY et al., 2005;
- [11] G. Vidal, J. Nieto, H. D. Mansilla; C. Bornhardt, Combined oxidative and biological treatment of separated streams of tannery wastewater. *Water Science and Technology*, 49(4), (2004), 287–292.

- [12] S. Aber; D. Salari; M. R. Parsa. Employing the Taguchi method to obtain the optimum conditions of coagulation–flocculation process in tannery wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 162(1), (2010), 127–134.
- [13] F. Pagnanelli, *et al.* Equilibrium biosorption studies in single and multi-metal systems. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 115-124. 2001.
- [14] W. Jianlong. Biosorption of cooper(II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Process Biochemistry*, vol. 37,(2002) p. 847-850.
- [15] V. C. G. Santos; J. V. T. M. Souza; C. R. T. Tarley; J. Caetano; D. C. Dragunski. Assessment of chemically modified sugarcane bagasse for lead adsorption from aqueous medium. *Water Science and Technology, Oxford*, v. 62, n. 2, p. 457-465, 2010.
- [16] S.K. Das, A.K. Guha, Biosorption of hexavalent chromium by *Termitomyces clypeatus* biomass: Kinetics and transmission electron microscopic study, *J. Hazard. Mater.* (2009), doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.037
- [17] APHA, 1985. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington, DC.
- [18] Bartlett RJ, James BR (1996) Chromium. In: Sparks DL (ed) *Methods of soil analysis*, Part 3, SSSA Book Series 5. SSSA, Madison, pp 683–701.
- [19] B. VOLESKY. *Biosorption of heavy metals*. CRC, 1990.
- [20] Y.S. Ho, G. McKay, Pseudo-second-order model for sorption processes, *Process Biochem.* 34 (1999) 451–465.
- [21] R. Kumar; N. R. Bishnoi; K. Bishnoi. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solution and electroplating wastewater using fungal biomass. *Chemical Engineering*
- [22] Z. Aksu. Equilibrium and kinetic modeling of cadmium(II) biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: effect of temperature, *Sep. Purif. Technol.* 21 (2002) 285–294.
- [23] S.R. Bai; Abraham, T.E. Biosorption of Cr(VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*, *Bioresour. Technol.* 79 (2001) 73–81
- [24] S.R. Bai; T.E. Abraham. Studies on chromium(VI) adsorption–desorption using immobilized fungal biomass, *Bioresour. Technol.* 87 (2003) 17–26.
- [25] S. Tunali; I. Kiran; T. Akar. Chromium(VI) biosorption characteristics of *Neurospora crassa* fungal biomass, *Miner. Eng.* 18 (2005) 681–689.

- [26] M, Nouri; S. Sepehr; M. Nasseri; A. Mazaheri; K. Yaghmaian. Chromium Bioremoval From Tannery Industries Effluent by *Aspergillus Oryzae.*, Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng, 2, (2005), 273-279.
- [27] M. Sen; M. Ghosh. Biosorption Of Cr (VI) by Resting Cells of *Fusarium Solani.*,Iran. J. Environ. Health. Sci. Engineering, 8, (2010), 153-158.
- [28] P. Venkateswarlu, R. Venkata, , R. Subba, R. Venkateswara. Removal of chromium from an aqueous solution using *Azadirachta indica* (Neem) leaf powder as an adsorbent. *International Journal of Physical Sci*, 2(8), (2007), 188-195.
- [29] S. Sharma; A. Adholeya. Detoxification and accumulation of chromium from tannery effluent and spent chrome effluent by *Paecilomyces lilacinus* fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65. (2011), 309–317.
- [30] R. B. GARCIA-REYES; J. R. RANGEL-MENDEZ. Adsorption kinetics of chromium (III) ions on agro-waste materials. *Bioresource Technology*, Essex, v. 101, p. 8099–8108, 2010.
- [31] D. D. Maksin; A. B. Nastasović;, A. D. Milutinović-Nikolić; L. T. Suručić; Z. P. , Sandić; R. V. Hercigonja; A. E. Onjia. Equilibrium and kinetics study on hexavalent chromium adsorption onto diethylene triamine grafted glycidyl methacrylate based copolymers. *Journal of hazardous materials*. 2012.
- [32] M. Özacar. Contact time optimization of two-stage batch adsorber design using second-order kinetic model for the adsorption of phosphate onto alunite. *Journal of hazardous materials*, 137(1),(2006) 218-225.
- [33] P. Suksabye; A. Nakajima; P. Thiravetyan; Y. Baba; W. Nakbanpote. Mechanism of Cr(VI) adsorption by coir pith studied by ESR and adsorption kinetic. *J. Hazard. Mater.* 161 (2009) 1103–1108.
- [34] J.P. Li; Q.Y. Lin; X.H. Zhang; Y. Yan. Kinetic parameters and mechanisms of the batch biosorption of Cr(VI) and Cr(III) onto *Leersia hexandra Swartz* biomass. *J. Colloid Interface Sci.* 333 (2009) 71–77.
- [35] P.L. Tang; C.K. Lee,; K.S. Low; Z. Zainal. Sorption of Cr(VI) and Cu(II) in aqueous solution by ethylenediamine modified rice hull *Environ. Technol.* 24, (2003), 1243–1251.
- [36] L. Ezzouhri, et al. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African journal of microbiology research* v. 3(2), 35-48, 2009.

CAPÍTULO 4

Int. J. Environ. Res. Public Health 2013, 10, 1-x manuscripts; doi:10.3390/ijerph100x000x

OPEN ACCESS

International Journal of
**Environmental Research and
Public Health**
ISSN 1660-4601
www.mdpi.com/journal/ijerph

Tratamento de efluente de indústria de curtume com biomassa de *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 em sistema de batelada

E. R. Santos^{1,3}, R. F. S. Andrade^{1,3}, R. A. Lima^{1,3}, M. C. F. Silva^{1,3}, E. S. Santos⁴, K. Okada³, G. M. Campos-Takaki³

¹ Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil; (ERS) santosmestrado@gmail.com;

² Programa Nacional de Pós-doutorado da CAPES, Universidade Católica de Pernambuco, CEP 50.050-900 Recife, PE, Brasil, (MCFS) martacfs@yahoo.com.br

³ Universidade Católica de Pernambuco, Boa Vista, CEP 50050-590 Recife, PE, Brasil. ((KO) kao@unicap.br ; (GMCT) galba_takaki@yahoo.com.br

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Norte Campus Universitário Lagoa Nova CEP 59078-900 | Nata/RN (E.S.S) everaldo@eq.ufrn.br

* Autor para quem deve ser endereçada a correspondência; E-Mail: galba_takaki@yahoo.com.br. Tel.: +55-81-21194044; fax: +55-81-21194043.

Recebido: / Aceito / Publicado em:

Resumo:

Estudos foram realizados para investigar o potencial do uso da biomassa de *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 na remoção de cromo, presente no efluente da indústria de curtume, bem como avaliar por testes de toxicidade os possíveis impactos que o mesmo pode causar ao meio ambiente. As investigações foram realizadas com o efluente bruto de curtume e tratado com biomassa de *C. elegans*, em diferentes concentrações. A análise do cromo residual foi avaliada no efluente indicando uma eficiência da biossorção de 92%. Verificou-se também, que a adsorção máxima do cromo do efluente foi corresponde 5,3 mg/g de

biomassa. Após o tratamento do efluente de curtume caracterizado observou-se redução dos parâmetros físico-químicos como turbidez, dureza em Ca e Mg e do teor de cloreto. A toxicidade foi avaliada utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*) e repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) como também o uso do microcrustáceo *Artemia salina*, sendo observado uma significativa redução da toxicidade comprovada pelo elevado índice de germinação das sementes mediante tratamento com a biomassa de *C. elegans* demonstrando sua potencial aplicação como biossorbente.

Palavras chave: *Cunninghamella elegans*, biossorção, cromo, efluente de curtume.

1. Introdução

A indústria de curtimento de couro é considerada uma das atividades com poluição de impactos graves nos corpos d'água, na medida em que algumas autoridades consideram o efluente de curtume, como uma das dez ameaças mais prejudiciais para o meio ambiente. Curtumes consistem em transformar o couro cru, um material altamente putrescível, em couro estável, com um valor comercial significativo [1,2].

O setor coureiro tem participação relevante na economia de diversos países, com as indústrias curtidoras processando anualmente aproximadamente 5,5 bilhões de metros quadrados de couro em negócios na ordem de US\$ 70 bilhões [3]. O Brasil, líder mundial na exportação de couro, processa anualmente cerca de 42 milhões de metros de couros [4]. Essa produção representa aproximadamente 1% do produto interno bruto (PIB) brasileiro, e emprega cerca de 50 mil trabalhadores [5].

O processo de curtimento do couro requer diversos processos mecânicos e químicos de tratamento que, em condições de baixa eficiência, resultam em grande quantidade de efluentes – 30 a 35 litros por quilograma de material cru processado – com altas concentrações de matéria orgânica e inúmeros produtos químicos tóxicos, como o Cromo e Sulfato, que podem resultar em irritações na pele, olhos, e trato respiratório, além de cânceres, problemas neurológicos e mutagênicos [6].

A relevância econômica da indústria curtidora, conjugada com seu potencial poluidor, vem intensificando nas últimas décadas a realização de pesquisas acadêmicas, que resultaram em maior conhecimento do processo industrial, e na evolução das tecnologias utilizadas para

tratamento e racionalização do processo produtivo. Estudos sobre tratamentos de efluentes industriais têm sido usados para remover metais pesados entre eles estão: carvão ativado, precipitação, coagulação, redução, processos com membranas e adsorção. A aplicação desses processos normalmente é restrita, uma vez que eles não podem garantir que a concentração dos metais esteja dentro dos limites requeridos pelas normas ambientais [7,8].

O efluente líquido gerado no curtimento é constituído por um líquido escuro com pH baixo, podendo apresentar elevada DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), sólidos em suspensão, nitrogênio orgânicos, ácidos minerais e orgânicos, sulfetos e cromo, todos com elevados teores no efluente do processo [9,10].

Os curtumes são os principais responsáveis pela libertação de grandes quantidades de cromo (na forma de sulfato de cromo), que tem uma maior tendência para converter em Cr (VI) no efluente. Determinados tipos de biomassa microbiana podem reter grandes quantidades de íons metálicos por adsorção passiva e/ou complexação, fenômeno este conhecido como biossorção, pois pode aliar baixo custo com grande capacidade de remoção de metais [11,3]. Os processos de biotransformação e biossorção são tecnologias que utilizam o potencial de micro-organismos para transformar ou adsorver metal [12,3].

Apesar da limitação na utilização de micro-organismos na indústria curtidora em condições reais, devido às variações nas características físico-químicas dos diversos tipos e composições dos resíduos nas diferentes fases do processo, mas com vistas a eventual integração dos processos biológicos na remoção e recuperação do cromo de curtumes, visando melhorias de eficiência e sustentabilidade ambiental, o presente trabalho objetivou estudar o processo de remoção do cromo no efluente de curtume, através do uso de biomassa do fungo *Cunninghamella elegans* e avaliar a redução do cromo no efluente de curtume através de testes de toxicidade.

2. Seção Experimental

2.1 Materiais e Métodos

2.1.1 Adsorvente: biomassa de *C. Elegans*

A produção da biomassa o micro-organismo o fungo de *C. elegans* foi crescido em placas contendo meio BDA (Batata-Dextrose-ágar) por 24 horas a 28°C, em seguida, foi transferido para frascos de Erlenmeyer contendo 200 mL do meio de cultivo constituído por uma

composição definida de asparagina 0,025%, sacarose 0,15%, e suplementado com 0,45% de milhocina sendo incubado à 28° C durante 96 horas sob agitação orbital de 150 rpm. A biomassa de *C. elegans* coletada após o período de incubação foi submetida ao processo de liofilização, sendo, posteriormente mantido em dessecador à vácuo até peso constante.

2.1.2 Efluente

O efluente pesquisado foi cedido por uma empresa localizada em Campina Grande no Estado Paraíba/ Brasil.

2.1.3 Ensaios de biossorção

Foram adicionadas concentrações: 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4gL⁻¹ de biomassa em Erlenmeyers contendo 200mL do efluente bruto contendo cromo VI em sua composição. Os ensaios foram acompanhados por 96h, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm a 28°C. Os testes foram realizados em triplicata. Os líquidos resultantes do cultivo das amostras em efluente de curtume, com diferentes concentrações de biomassa de *C. elegans*, foram filtrados e em seguida foram realizadas as análises da cinética de adsorção.

2.1.4 Estudo Cinético da adsorção

O estudo da cinética de adsorção do cromo pela biomassa de *C. elegans* nas diferentes concentrações foi realizado após o período 96 horas, sendo as alíquotas analisadas para determinação do Cr(VI) residual pela técnica de espectroscopia de absorção atômica (EAA) e posterior análise quanto a capacidade de biossorção e eficiência da remoção do cromo.

2.1.5 Quantificação do cromo residual

Após o cultivo de *C. elegans*, em distintas quantidades inseridas no efluente de curtume, as amostras foram filtradas e o líquido remanescente do efluente de curtume foi avaliado por espectroscopia de absorção atômica (EAA) através do equipamento (Analyst 800 Perkin Elmer). A avaliação da capacidade de remoção do cromo presente no efluente, assim

como a eficiência desta adsorção pela biomassa de *C. elegans* foram calculadas pelas equações a e b, respectivamente:

$$q = V (C_i - C_f) / m \quad (a)$$

$$R = (C_i - C_f) \times 100 / C_i \quad (b)$$

Onde: C_i e C_f , são respectivamente, as concentrações inicial e final do efluente (mg/L).

q é a capacidade de remoção de cromo mg/g de biomassa

R é a eficiência de adsorção pela biomassa

2.1.6 Análise físico-químicas do efluente de curtume

As análises físico-químicas do efluente de curtume foram realizadas em triplicata. A coleta da amostra foi realizada em frascos de polietileno previamente limpos e esterilizados e, transportados ao Laboratório de físico-químicas da Universidade Católica de Pernambuco. Os parâmetros avaliados foram: cromo total, pH, dureza total, cálcio, cálcio e magnésio, magnésio, cloreto, condutividade elétrica, cor real, cor aparente, turbidez, DQO, como sugerido por [14].

2.1.7 Testes de toxicidade do efluente de curtume tratado com biomassa de *C. elegans*

Os testes de toxicidade foram realizados com o efluente do curtume tratado com a biomassa de *C. elegans* e com o efluente de curtume bruto. A toxicidade foi avaliada utilizando três indicadores: o crustáceo *Artemia salina*, sementes de Repolho Chato de Quintal (*Brassica oleracea var. capitata*) e Alface baba de verão (manteiga) *Lactuca sativa*. O primeiro teste foi realizado com a *Artemia salina* e determinado quanto a toxicidade pela porcentagem de morte dos organismos em relação ao seu número total (10 larvas), na presença de diferentes concentrações do efluente tratado (v/v de 25%, 50% e 75%), diluídas em 5 ml de uma solução aquosa de sal marinho sintético (33,3g L), incubados por 24h. O volume máximo da amostra teste (líquido metabólico) foi de 1,5ml [15](MC LAUGHLIN et al. 1985). Em seguida, foi realizada a contagem dos organismos sobreviventes, determinando-se assim a concentração letal (CL_{50}) pelo método de Trimmed Spearman-Kärber [16]. Os testes foram realizados em triplicata.

O segundo teste para avaliar a fitotoxicidade, foi realizado com sementes de Repolho Chato de Quintal (*Brassica oleracea var. capitata*) e Alface baba de verão (*Lactuca sativa*)

previamente lavadas e esterilizadas, usando o controle com água destilada. Em seguida foram distribuídas em placas de Petri um quantitativo de dez sementes junto com o efluente tratado com a biomassa de *C. elegans*, nas concentrações de 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4gL⁻¹. Nos ensaios foram observados a quantidade de sementes germinadas e o comprimento da raiz, e então calculado o índice de germinação (%) e o crescimento médio da raiz (%). Os resultados foram calculados pelas equações abaixo segundo Tiquia *et al*, (1996), [17].

(% Média de Relativa da Germinação)

$$\% G = \frac{\text{média de sementes testes germinadas} \times 100}{\text{média de sementes germinadas controle}}$$

(% Média Relativa do Crescimento da Raiz)

$$\% CR = \frac{\text{média de sementes testes germinadas} \times 100}{\text{média do crescimento da raiz controle}}$$

(% Média Relativa do Índice de Germinação)

$$IG = \frac{[(\% \text{ germinação da semente}) \times (\% \text{ crescimento da raiz})]}{100\%}$$

3. Resultados e Discussão

3.1 Efluente bruto de curtume tratado pela biomassa de *C. elegans*

Neste estudo, a biomassa de *C. elegans* produzida em meio de cultivo alternativo de baixo custo contendo milhocina, foi utilizado para a adsorção do cromo, a fim de determinar a eficiência como um método alternativo para o tratamento de águas residuais contendo esse metal tóxico.

A análise da remoção do cromo no efluente em função da concentração da biomassa de *C. elegans* é apresentado na Figura 1. Os resultados da cinética de biossorção após 96 horas demonstrou um aumento em função da concentração da biomassa utilizada, sendo verificado uma eficiência de biossorção de 38, 62, 63 e 92% respectivamente para as concentrações 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4g de biomassa.

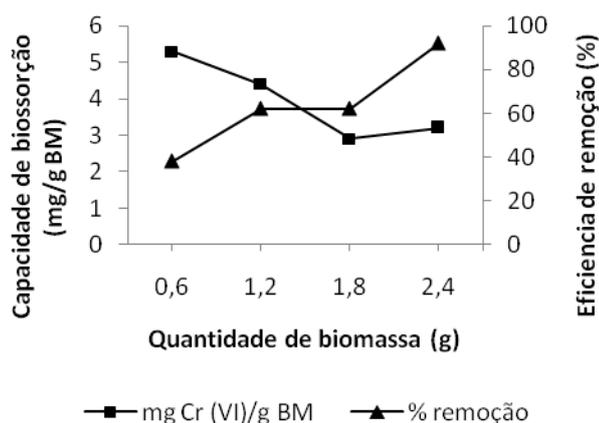


Figura 1 - Capacidade de biossorção e eficiência de remoção do cromo pela biomassa *C. elegans* no efluente de curtume

Para as concentrações 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4g de biomassa a capacidade máxima de adsorção foram obtidos valores respectivamente de 5,3; 4,4; 2,9 e 3,2mg/g biomassa. Embora, os dados obtidos indicam uma maior capacidade de adsorção nas menores concentrações de biomassa deve se verificar que as concentrações do cromo no efluente e o tempo de contato foram iguais para as concentrações de biomassa, e deve-se levar em conta que o processo de adsorção é dependente da concentração do cromo e do tempo de interação com o adsorvente. Estas características foram observadas por [18] utilizando *Aspergillus niger* para remoção de cádmio de efluente da indústria de petróleo.

3.2 Avaliação do efluente de indústria de curtume

A tabela 1, apresenta os parâmetros físico-químicos do efluente bruto e tratado. Os resultados demonstraram que o efluente possui pH neutro e satisfatórias quantidades de micronutrientes como o cálcio e magnésio. O cloreto, a turbidez, e a dureza total em Ca e Mg possuem elevados teores, sendo estes considerados fatores químicos importantes que contribuem na poluição causada pelo efluente. Na análise do efluente tratado estão apresentados os resultados da caracterização nas concentrações de biomassa 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4g. A presença da biomassa em contato com o efluente de curtume influenciou na mudança do pH. O efluente tratado com a biomassa em pequena concentração ($0,6g.L^{-1}$) modificou para o pH ácido. Ao aumentar a concentração da biomassa o pH apresentou caráter levemente

neutro em todas as demais condições testadas. Observou-se também uma redução na concentração do nível de dureza para o cálcio (99,5%), magnésio (56,0%) e cloreto (76,9%).

Outro parâmetro importante foi a análise da quantidade de oxigênio necessária para degradar a matéria orgânica (DBO). Quando comparado ao efluente bruto, os valores de DQO após o tratamento com a biomassa reduziram, exceto no tratamento com 2,4g da biomassa, indicando o início da remoção da matéria orgânica.

Quanto a quantificação do cromo total no efluente de curtume foi obtido em valor de 42,46 mg/L de cromo; e após o tratamento com biomassa nas concentrações de 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4 g foram obtidos valores de cromo residual respectivamente de 26,36; 16,3; 16 e 3,3 mg/L de cromo o que demonstra a redução do cromo respectivamente de 37,8%; 61,6%; 62,3% e 92,2% pelo tratamento.

Tabela 1 - Avaliação físico-química do efluente de curtume tratado com biomassa de *C.elegans*

Parâmetro	Amostra Efluente bruto	Amostras de biomassa com efluente tratado			
		(0,6gL ⁻¹)	(1,2gL ⁻¹)	(1,8gL ⁻¹)	(2,4gL ⁻¹)
pH Inicial	6.9	6,17	6,96	6,96	6,55
pH Final	-----	4,2	7,28	7,28	7,68
Dureza Total (mgCaCO₃/L)	1000	1200	1000	1100	950
Cálcio (Ca)	9218,4	116,23	68,13	64,12	44,08
Magnésio (mgMg⁺⁺/L)	187,18	121,22	101,77	128,51	104,20
Cloreto (mg/LCl₂)	2162,43	2012,44	1712,45	1587,45	1662,45
Condutividade elétrica (mS)	3910	6280	6530	6450	6750
Turbidez (NTU)	255.75	10,92	40,17	84.90	224,22
DQO mg/LO₂	2625,3	2112,3	2002,1	18105	1207,0
Cromo (mg/L)	42,46	26,36	16,3	16	3,3

3.3 Toxicidade do efluente tratado com *C.elegans*

A toxicidade do efluente bruto e tratado foi avaliada, usando como bioindicadores a *Artemia salina* e sementes de repolho Chato de Quintal (*Brassica oleracea* var. *capitata*) e Alface baba de verão (*Lactuca sativa*). Os resultados indicaram que em todas as concentrações de biomassa testadas, o percentual de mortalidade do microcrustáceo foi maior que 50% impossibilitando desta forma, o cálculo pela CL_{50%}, uma vez que apresentaram elevados percentuais de toxicidade. Este estudo sugere que para a obtenção de resultados significativos de baixa toxicidade, nas condições estudadas neste trabalho, deve-se aumentar a concentração da biomassa de *C.elegans* no cultivo em efluente de curtume. A amostra controle (efluente de curtume bruto) apresentou 100% de toxicidade.

As sementes do repolho e do alface são sensíveis a substâncias tóxicas tais como metais pesados e por isso, foram usadas como bioindicadores para avaliação da toxicidade no líquido resultante do cultivo da biossorção do cromo pela biomassa de *C. elegans*. Segundo a análise feita, percebeu-se que o líquido resultante do cultivo com 2,4gL⁻¹ da biomassa apresentou IG (índice de germinação) elevado para o alface e o repolho, o que representa a capacidade de *C. elegans* na redução da toxicidade do efluente de curtume (Figura 2).

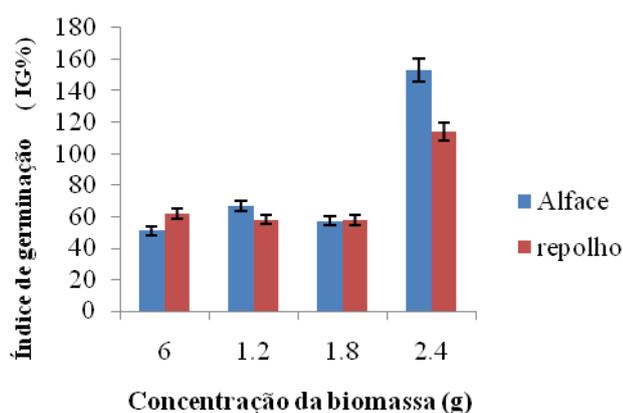


Figura 2 - Avaliação da fitotoxicidade com sementes de repolho e alface através do índice de germinação no efluente de curtume tratado com a biomassa de *C.elegans* em diferentes concentrações.

A exposição das sementes de alface e repolho ao efluente bruto de curtume tratado com a biomassa de *C. elegans* foi determinante na avaliação do potencial de toxicidade do

efluente de curtume, comprovado pelo maior porcentual de índice de germinação, como mostra a figura 3, indicando ser a bioissorção de cromo por *C.elegans*, uma ferramenta valiosa para representar uma alternativa de redução dos impactos causados pela presença de cromo em efluentes industriais.

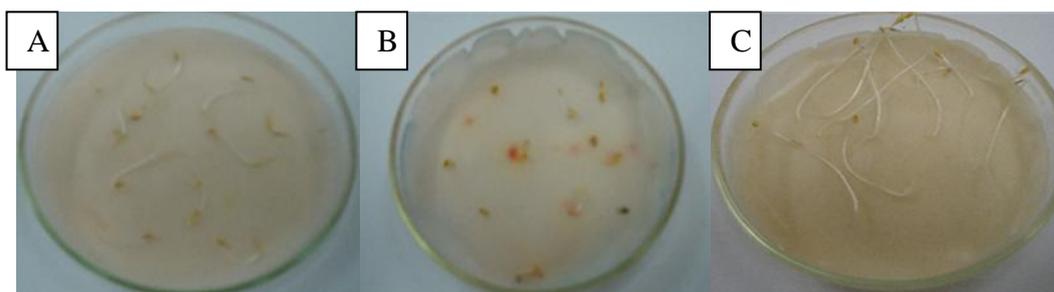


Figura 3 - Avaliação da fitotoxicidade germinação com sementes de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) no líquido resultante do trado com biomassa de *C.elegans*. (A) água (controle), (B) efluente de curtume bruto (não tratado) e (C) efluente de curtume tratado (com $2,4\text{g.L}^{-1}$ de biomassa) após 96 horas.

4. Conclusões

Os dados apresentados comprovam que a biomassa *Cunninghamella elegans* usada como bioissorvente é capaz de remover o cromo do efluente sendo obtido uma redução de até 92,2% pelo tratamento com a concentração máxima de biomassa 2,4g. Houve também uma diminuição significativa da toxicidade do efluente como verificado pelo percentual no índice de germinação nas sementes o que sugeri que o micro-organismo *Cunninghamella elegans* é potencialmente aplicável em processo de tratamento para remoção do cromo provenientes de efluentes industriais ou de ambientes contaminados por metais.

Agradecimentos

Este trabalho teve suporte financeiro da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Os autores agradecem ao Centro de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, pela utilização dos seus laboratórios.

5. Referências

1. Suresh, V.; Kanthimathi, M.; Thanikaivelan, P.; Raghava Rao, J.; Unni Nair, B. An improved product-process for cleaner chrome tanning in leather processing. *Journal of Cleaner Production*, **2001**, 9 (6) 483– 491.
2. Godecke, M.C.; Rodrigues, M.A.S.; Naime, R.H. Resíduos de curtumes: estudo das tendências de pesquisa em Gestão, *Educação e Tecnologia Ambiental*. **2012**, 7 (7) 1357-1378.
3. Aber, S.; Salari, D.; Parsa, M.R. Employing the taguchi method to obtain the optimum conditions of coagulation–flocculation process in tannery wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, **2010**, 162, 127-134.
4. Martines, A.M. *et al.* Ammonia volatilization in soil treated with tannery sludge. *Bioresource Technology*, **2010**, 101 4690–4696.
5. Figueiredo, J.A.S; Prodanov, C.C.; Daroit, D. Impacts of the globalized economy on the environment: the tanning industry in the Vale do Rio dos Sinos. *Brazilian Journal of Biology*, **2010**. 70 (4) (suppl.) 1231-1243.
6. Rodrigues, M.A.S. Application of photoelectrochemical and electro dialysis treatment for the recovery and reuse of water from tannery effluents. *Journal of Cleaner Production*, **2008**, 16 605 – 611.
7. Liu, S. *Food and agricultural wastewater utilization and treatment*. Ames: Blackwell Publishing, **2007**, p. 277.
8. Marengoni, N.G.; Klosowski, E.S.; Oliveira, K.P.; Chambo, A.P.S.; Junior, A.C.G. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu binacional. *Química Nova*, **2013**, v. XY, n. 00, p. 1-5.
9. Gutterres, M. *A ciência rumo`a tecnologia do couro*. 1. ed. Porto Alegre Editora Tríplice Acessoria e Soluções Ambientais. **2008**, p. 171-179, p. 289-296, v. 1. 505.
10. Gamba, V. S. Avaliação do lodo de curtume como fonte de nutrientes para o crescimento inicial de eucalipto. **2012** (Dissertação mestrado em Ciência Florestal), Botucatu, São Paulo, p. 93.

11. Jianlong, J. W. Biosorption of copper (II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, **2002**, 37 847–850.
12. Aber, S.; Salari, D.; Parsa, M. R. Employing the Taguchi method to obtain the optimum conditions of coagulation– flocculation process in tannery wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, **2010**, 162 (1) 127–134.
13. Ednaldo, R. S.; Adamares, M.S; Marta, C.F.S; Antônio, C. S; Sérgio, C.P; , Kaoru, O; Galba M.C.T. Efeitos da associação sacarose, asparagina e milhocina na produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 em fermentação submersa, *Molecules*, **2013**, 18, 1-x manuscrito; doi:10.3390.
14. SILVA, M. *Análises físico-químicas para controle das estações de tratamento de esgotos*. 1a ed., BABES: São Paulo-SP, **1995**. 223p.
15. VALENTE, JPS; PADILHA, PM e SILVA, AMM. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu-SP. *Eclét. Quím.* **1997**, 22,. 1-12
16. Youn – Joo. A. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere*, **2006**, 8, 1359-1365.
17. Tiquia, S.M.; Tam, N.F.Y.; Hodgkiss, I.J. Of Composting on Phytotoxicity of Spent Pig-Manure Sawdust Litter. *Environmental Pollution*, **1996**, 93 249-232.
18. Barros, J. L. M. *Biossorção de metais pesados presentes em águas de produção de campos de petróleo*. Dissertação de Mestrado. Dissertação de Mestrado, **2001**, Um universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Pelos autores; licenciado MDPI, Suíça. Este artigo é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos e condições da licença Creative Commons Atribuição (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

ANEXOS

ANEXO A – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1

Dear Dr. Campos Takaki,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission and editorial system at www.mdpi.com. One of our editors will be in touch with you soon.

Manuscript ID: molecules-31989

Type of manuscript: Article

Title: An abundant supply of amino acids enhances the biomass and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 in submerged fermentation

Authors: Ednaldo Ramos dos Santos, Marta Cristina Freitas da Silva, Patrícia Mendes Souza, Antonio Cardoso Silva, Sergio Carvalho de Paiva, Clarissa D. C. Albuquerque, Aline Elesbão Nascimento, Kaoru Okada, Galba M. Campos-Takaki *

Received: 05 March 2013

E-mails: santosmestrado@gmail.com, martacfs@yahoo.com.br, tyttams@hotmail.com, antoniocardoso2000@yahoo.com.br, sergio@unicap.br, albqq@yahoo.com.br, elesbao@unicap.br, kao@unicap.br, galba_takaki@yahoo.com.br

Submitted to special issue: Triterpenes and Triterpenoids,

http://www.mdpi.com/journal/molecules/special_issues/triterpenes-triterpenoids/

Kind regards,

MDPI AG

--

Molecules Editorial Office

Postfach, CH-4005 Basel, Switzerland

Office: Kandererstrasse 25, CH-4057 Basel

Tel. +41 61 683 77 34 (office)

Fax +41 61 302 89 18 (office)

E-mail: molecules@mdpi.com

<http://www.mdpi.com/journal/molecules/>

*** This is an automatically generated email ***

ANEXO B - ARTIGO 1 (VERSÃO LÍNGUA INGLESA)

Molecules **2013**, *18*, 1-x manuscripts; doi:10.3390/molecules180x0000x

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

An abundant supply of amino acids enhances the biomass and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 in submerged fermentation

Ednaldo Ramos dos Santos^{1,4}, Marta Cristina Freitas da Silva^{2,4}, Patrícia Mendes de Souza^{2,4}, Antonio Cardoso da Silva³, Sergio Carvalho de Paiva⁴, Clarissa D. C. Albuquerque⁴, Aline E. Nascimento⁴, Kaoru Okada⁴, Galba M. Campos-Takaki^{4*}

¹Doctorate of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil; (ERS) santosmestrado@gmail.com

²National Program of Post-doctorate, Catholic University of Pernambuco, 50.050-900 Recife, PE, Brasil, (MCFS) martacfs@yahoo.com.br; (PMS) tyttams@hotmail.com

³Departament of Education of Pernambuco State, 50.810-000 Recife, PE, Brasil. (ACS) antoniocardoso2000@yahoo.com.br

⁴ Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco , 50050-590 Recife, PE, Brasil.(ACS) (CDCA) albqqs@yahoo.com.br; (SCP) sergio@unicap.br; (AEN) elesbao@unicap.br; (KO) kao@unicap.br ; (GMCT) galba_takaki@yahoo.com.br

*Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: galba_takaki@yahoo.com.br Tel.: +55-81-21194044; fax: +55-81-21194043.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: Studies were carried out with *Cunninghamella elegans* UCP / WFCC 0542 to evaluate the effects of abundant supply of amino acids asparagine and corn steep liquor associated to saccharose on biomass and chitosan production by submerged fermentation. The concentrations of the components of the culture medium were determined using a full factorial design of 2³ to evaluate the interactions and effects of the independent variables of the sucrose, asparagine and asparagine corn steep liquor variables, in relation to the content of carbon and nitrogen in the response variable of chitosan production regarding

biomass. The results indicated that the assays of the central point (asparagine 0.025%, 0.15% sucrose supplemented with 0.45% corn steep liquor), with a C:N ratio of 2:6, gave maximum yields of biomass 16,95g/L and chitosan 2.14 g/L after 96 hours of cultivation. The infrared spectrum absorption of the chitosan produced by *C. elegans* showed bands related to OH-axial stretching between 3406 and 3432^{cm-1}, superimposed on the NH stretching band with axial deformation of amide C = O at about 1639^{cm-1}, NH angular deformation at approximately 1560^{cm-1}; axial deformation of amide-CN around 1421^{cm-1}, symmetrical angular deformation in CH₃ 1379 ^{cm-1}, -CN axial deformation of amino groups from 1125 to 1250^{cm-1} and polysaccharide structures bands in the range of between 890-1150 ^{cm-1}. The crystallinity index of chitosan was 60.92%, and its deacetylation degree was 75.25%. The low percentage of sucrose and asparagine substrates supplemented with corn steep liquor at the factorial design central point offer high biomass and chitosan production at low cost.

Keywords: *Cunninghamella elegans*; chitosan; sucrose; asparagine; corn steep liquor.

1. Introduction

The *Cunninghamella* genus presents fast-growing fast colonies, in a color ranging from white to gray, erect sporangiospores, branched and at the end of each branch, pyriform or globose vesicles with many sporangia are formed. When young, the mycelium does not have a septum. Septation is associated with the age of the culture [1,2].

The *Cunninghamella* genus includes representatives with the ability to catabolize xenobiotic, especially aromatic, compounds, pharmacological drugs and heavy metals by biosorption, in addition to which it can perform the biological desulfurization of organic sulfur dibenzothiophene - DBT [3,4,5,6].

The nutrients used for microbial growth depend on a certain balance of carbon and nitrogen sources needed for the secondary production of metabolites. In order to utilize industrial waste, knowledge is needed of the quantity and quality of carbohydrates, proteins or lipids to be used as a substrate for the biotechnological production of compounds [7,8]. Thus, the search for agro-industrial substrates such as renewable sources as an alternative technology for producing biomass and chitosan by using important parameters such as agitation speed, temperature, pH, and particularly, sources of carbon and nitrogen [9, 10,11,12, 13, 14].

Among the renewable sources obtained from agribusiness, corn steep liquor is undoubtedly one of the most widely used byproducts. Corn steep liquor is obtained from processing maize which is rich in amine compounds, such as essential amino acids, vitamins, and other nutrients and is used as a food supplement in the manufacture of feed for poultry and ruminants. However, corn steep liquor has also proven to be a

nutritional source of low cost, acting effectively as a nitrogen source in various fermentation processes for obtaining high value-added input [15, 16, 17, 18, 19, 20].

Moreover, chitin is the second most abundant polysaccharide in Nature. It is synthesized mainly by fungi, nematodes and arthropods. Some researchers consider chitin as a cellulose derivative because both assume a similar molecular structure were observed [21,22]. Galba, há algo errado na sentença anterior. A palavra 'both' refere-se aos pesquisadores ou as propriedades de quitina? Acho que as palavras 'were observed' podem ser apagadas. Chitin and chitosan polymers are considered biodegradable and biocompatible homopolysaccharides, produced by natural sources, which comprise units of 2-acetamide-2-deoxy-D-glucosamine and 2-amine-2-deoxy-D-glucosamine respectively, attached by β (1-4) links, in which the relative proportion of these units and the glycoside solubility differ [23,24].

Chitosan is a biodegradable polymer of high molecular weight with several important applications because of its main characteristics such as low toxicity, high biodegradability and being able to produced it from renewable substrates. It is applied in fields such as medicine and the pharmaceutical, agriculture and food industries due to its versatility [25, 26,27].

Chitosan can be obtained from partial chitin deacetylation from the crustaceans exoskeletons of crustaceans. However, in obtaining some residues, it can cause allergic problems. Thus, the use of fungi, especially those of the order Mucorales, represents great biotechnological potential, given that the content of chitin and chitosan in their cell walls is significant [28].s of

In this study, investigations were carried out with the combination of substrates of sucrose, asparagine and corn steep liquor at low concentrations in biomass chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP/ WFCC 0542, in order to learn of the influence of the Carbon: Nitrogen ratio of 2:6.

2. Results and discussion

2.1 Effects of sucrose, corn steep liquor and asparagine on biomass and chitosan production

Initially an investigation was made of the nutritional requirement of *Cunninghamella elegans* towards the components of the medium of sucrose, corn steep liquor and asparagine, given a C:N ratio of 2:6 (excess nitrogen source), and the production of biomass and chitosan as per the independent variables, as shown in Table 1. The results showed that corn steep liquor fostered an increase in biomass production, by increasing the carbon/nitrogen ratio in all assays of factorial design. The higher biomass and chitosan was observed at the central points of the full factorial design of 2^3 , with higher values observed, corresponding to 16.95g / L for biomass and an excellent production (2.14 g/L) of chitosan.

The data suggest that the association of sucrose, asparagine with corn steep liquor (asparagine 0.025% and 0.15% sucrose with 0.45% milho) presents the best condition. The initial pH ranged from 4.01 to

4.66 rising to 5.10 to 5.48. The pH of the medium changed but remained in the acidic range which suggests the optimum condition for the activity of enzyme chitin deacetylase for chitosan production, considering that the optimum enzyme pH is 4.5, according to Kafetzopoulos [29]. The increase of biomass is explained by the enrichment from the presence of amino acids (leucine, isoleucine, lysine, methionine, tyrosine, phenylalanine, threonine and serine), vitamins (biotin, chol changed ine, inositol, niacin, pyridoxine, riboflavin, thiamine and pantothenic acid), which, according to Benedict [30], are nutritive sources essential for biomass and chitosan production by *C. elegans*.

Table 1 – Biomass and chitosan production by *Cunninghamella elegans*

Test	pH		Biomass (g/L)	Chitosan (g/L)
	Initial	Final		
1	4.66	5.30	10.83	0.60
2	4.01	5.10	11.12	1.51
3	4.02	5.46	14.62	1.07
4	4.59	5.09	10.63	1.93
5	4.01	5.48	14.64	2.03
6	4.01	5.40	14.72	1.52
7	4.03	5.37	13.47	1.04
8	4.02	5.15	14.02	1.55
9	4.03	5.44	16.95	2.10
10	4.02	5.21	16.03	2.08
11	4.01	5.50	15.77	2.12
12	4.01	5.29	15.52	2.14

Experimental design 2³ to biomass and chitosan production:

Asparagine %: -1(0); 0 (0.025); 1(0.05); Sucrose %: -1(0.1); 0(0.15);

1 (0,2) ; Corn Steep Liquor %: -1 (0.3); 0 (0.45); 1 (6)

Studies undertaken by [30] using *Gongronella butleri*, (? apagar: even inserir: another) Mucorales fungus, obtained 1.19 g/L of chitosan after 72h of cultivation, a lower amount than that produced by *C. elegans* (? apagar: as inserir: with) sucrose, asparagine supplemented with corn steep liquor. While Cardoso et al. 2012 [20] using corn steep liquor and honey as medium components to produce biomass and chitosan by *Rhizopus arrhizus* found yields of 20.61 g/L and 29.3 mg/g respectively, the latter being less than the one obtained in this study.

2.2 Assessment of independent variables on the biomass and chitosan production

The experimental data obtained in this study were subjected to statistical analysis to evaluate the effects of the components of the culture media (sucrose, corn steep liquor and asparagine) on the biomass yield. The Pareto chart showed the standard effects of a 95% confidence level with the factors of sucrose, asparagine, and corn steep liquor. The analysis of the factors and levels used demonstrate that the independent variable of only corn steep liquor was the most positive variable of the chemical components on the yield of biomass production. However, sucrose alone did not positively influence the growth of microorganism, suggesting the preference of *C. elegans* for corn steep liquor. Therefore, the results suggested that there was a better physiological adaptation of *C. elegans* present when the corn steep liquor (an agroindustrial residue rich in vitamins, minerals and amino acids), probably as due to its being present in essential amino acids. These results are supported by the literature on the biomass production of filamentous fungi, yeast and bacteria using corn steep liquor as an essential source in the chemical composition of the culture media used in fermentation processes [7, 8].

Figure 1. Pareto Chart of standardized effects for 2^3 full factorial design having as independent variables: (1) asparagine (2) sucrose (3) milhocina and (4) corn steep concentrations as a response variable on biomass production by *Cunninghamella elegans*

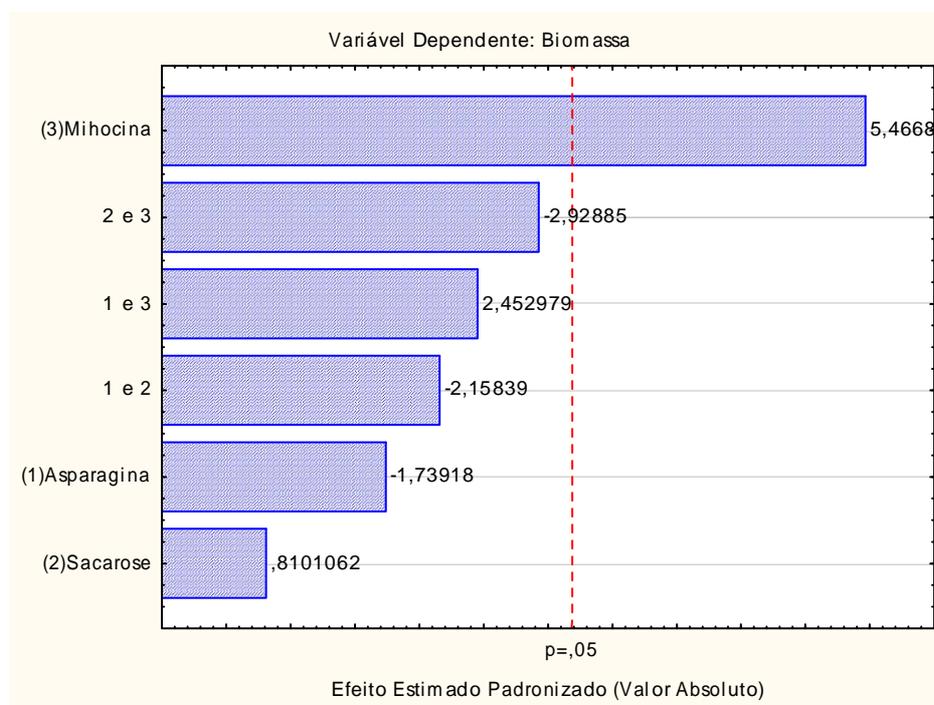


Figure 2 is a Pareto chart the results of which show the influence of the nutritional sources for the production of chitosan in the interaction of the asparagin and corn steep liquor, and asparagines and sucrose on the formation of the biopolymer. The results also show the influence of asparagine and corn

steep liquor on the increase in chitosan yields, and that of sucrose and asparagine is statistically significant for the yields of chitosan by *C. elegans*. However, the interaction of sucrose and corn steep liquor, and the interaction of asparagin and corn steep liquor caused negative effects, with statistical significance on the chitosan yield. A higher concentration of corn steep liquor, as agroindustrial residue, a rich component in amino acids and vitamins, was assimilated by the micro-organism tested on chitosan production. These results are supported by the literature as to not only the positive effect on the uptake of constituents of corn steep liquor, in amounts of 6% to 16% [11, 19] but also as to the positive influence on the increased production of chitosan with supplementation of only 0.45% of corn steep liquor [31].

Figure 2. Pareto chart for chitosan yield produced by *Cunninghamella elegans* related to carbon and nitrogen sources.

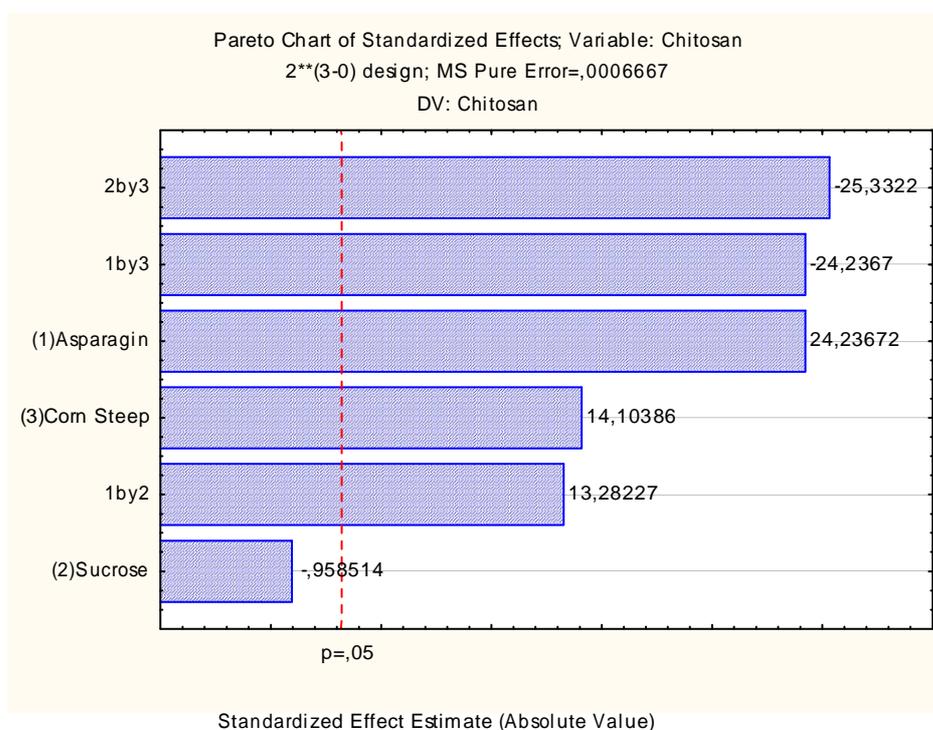


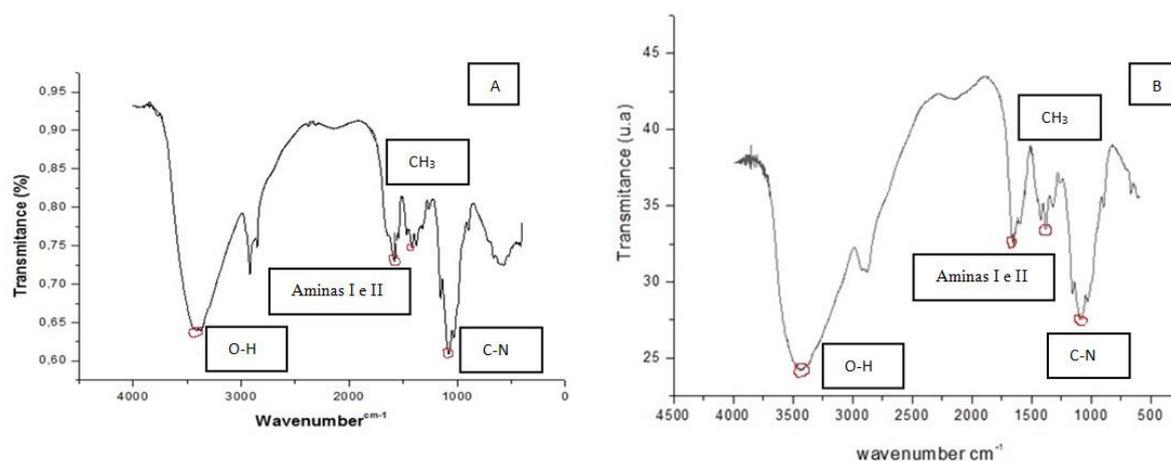
Figure 2, shows surface response interactions between asparagine and corn steep liquor, asparagine and sucrose and corn steep liquor, and in detail the supplementation effect of corn steep liquor. The most positive influence on chitosan production was observed in the interaction between sucrose and corn steep liquor, and the high values of chitosan production by the fungus *Cunninghamella elegans* were shown.

The interaction between sucrose and asparagine was demonstrated to be a negative condition for chitosan production. However, positive results were observed for asparagine with corn steep liquor with a high value in chitosan production.

2.3 Physical-chemical properties of chitosan

The physical-chemical characterizations of the polymer isolated by X-ray diffraction and infrared absorption spectra are shown (Figures 2A and 2B). In the absorption spectrum of the infrared ray, bands were observed related to OH-axial stretching between 3406 and 3432 cm^{-1} , superimposed on the NH stretching band; with axial deformation of amide C=O at about 1639 cm^{-1} , angular deformation of NH approximately 1560 cm^{-1} ; axial deformation of amide-CN around 1421 cm^{-1} ; symmetrical angular deformation in CH_3 1379 cm^{-1} ; -CN axial deformation of amino groups between 1125-1250 cm^{-1} and polysaccharide structures bands in the region between 890-1150 cm^{-1} . Therefore, the profile of the absorption spectra presented by the infrared ray of the *C. elegans* chitosan isolated is supported by the literature [1, 11,15]. The infrared spectroscopy of chitosan obtained by *C. elegans* at the central point of the 2^3 factorial experimental design (Table 1) and commercial chitosan (Polymar) were used to determine the degree of deacetylation [15]. The chitosan degree of deacetylation and polymer microbial standard obtained were 75.25% and 78.5%, respectively, verifying that through spectra in the infrared region the microbial chitosan degree of deacetylation exceeds 11% compared to the commercial standard. An investigation of the use of chitosan for removing pollutants in the effluent textile Silva [32] characterized the chitosan sample extracted from the mycelium of *C. elegans* and showed that the degree of deacetylation quality exhibited was slightly superior to the commercial standard used as a reference. In an experiment carried out to obtain chitosan produced by the filamentous fungus *Rhizopus arrhizus* observing a degree of deacetylation of 88.2%, a result statistically similar to that obtained in this study was found [16].

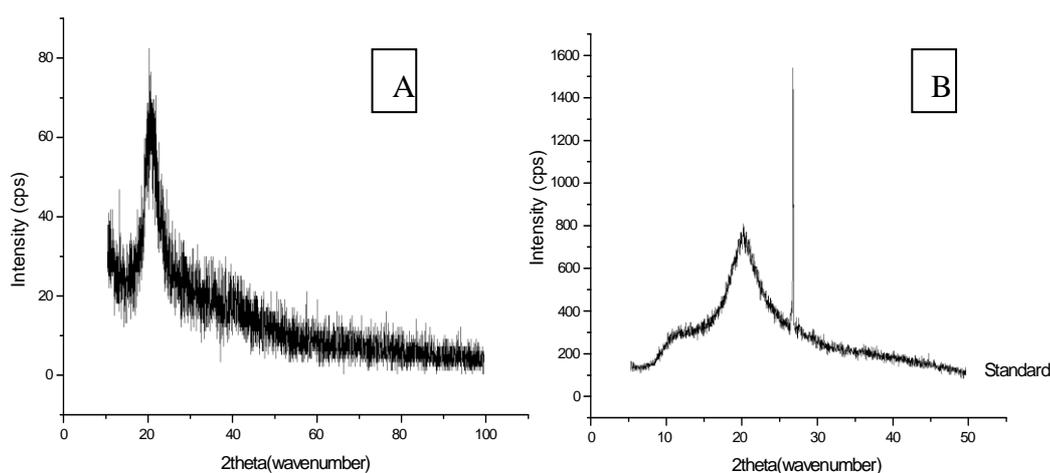
Figure 2. Infrared absorption spectra (A) Chitosan produced by microbiological *Cunninghamella elegans* grown on sucrose, asparagine and corn steep liquor medium (C:N; 2:6) and (B) Commercial chitosan.



From the X-ray diffraction, obtained from chitosan which was obtained from microbiological *C. elegans* in the best condition of factorial design, the crystallinity index (I_{CR}) was calculated, the result being equal to

60.92%, which is higher than the crystallinity index (56.94%) of the standard sample (Figures 3A and 3B). By analysis of X-ray diffraction, observations were made on the degree of ordering of the polymer, which can be influenced by many factors, particularly, processes of isolation and lyophilization, as per the literature [17, 21, 23, 27]. Thus, the crystallinity indices are related to the physical-chemical properties of the polymer, changes to which can be related, thus confirming the high degree of deacetylation of the chitosan [24]. The results of this study are consistent with the literature [21].

Figure 3. X-ray diffractograms of chitosan. (A) microbiological Chitosan of the *C. elegans* in the best condition of the full factorial design. (B) X-ray diffractograms of commercial chitosan.



3. Experimental Section

3.1. Microorganism and maintenance

Use was made of a *Cunninghamella elegans* strain UCP/WFCC 0542 deposited in the Culture Collection of the Research Center of Environmental Science -NPCIAMB/UNICAP, registered at the World Federation for Culture Collection (WFCC). The culture was maintained on PDA medium (Potato Dextrose Agar) at 5°C.

3.2 Biomass production by *C. elegans*

The inoculum was performed by transferring sporangiospores of the *C. elegans* to Erlenmeyer flasks containing 100 mL of sterile distilled water to obtain a suspension of 10^7 cells/mL. Aliquots (1 mL) were transferred to Petri dishes (9.0 cm/diameter) containing PDA medium (Potato Dextrose Agar) incubated for 24 hours at 28°C. Subsequently, 20 disks (30x6mm) were transferred to production medium concentrations, as established by factorial design, in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium consisting of corn steep liquor, asparagine and sucrose (Table 2). Cultivation was carried out under orbital shaking of 150 rpm at 28°C for 96 hours. At the end of cultivation, the mycelial mass of *C. elegans* was obtained by vacuum filtration, washed with cold sterile water, frozen and lyophilized. It

was then kept in a desiccator until constant weight. The biomass was determined gravimetrically and expressed as g/L.

3.3 Extraction of chitosan

The extraction of the biopolymer chitosan was performed by alkali/acid treatment which consists of deproteinizing the biomass, lyophilized with the addition of a sodium hydroxide solution (1M/30mL/g/121°C for 15min), separating the alkali-insoluble fraction (AIF) after centrifugation (4000rpm/15min) by vacuum filtration. After separation of the AIF, it was washed and the material was filtered in alternate stages with saline solution (0.85%) and ice-cold distilled water until pH 7.0. The residue obtained after this step was subjected to treatment with acetic acid (30 mL 2%/v/g 100°C for 15min) centrifuged (4000rpm/15min) and filtered. The residue was washed with cold distilled water and centrifuged (4000rpm) until pH 7.0, to obtain chitin. Then it was placed in a drying oven (30°C/48h.) The supernatant was alkalinized to pH 9.0, kept in a refrigerator for 24 hours for precipitation and concentration of the chitosan. Having obtained chitosan by centrifugation (4000rpm/15min), it was washed with ice-cold distilled water and saline solution to pH 7.0. The chitosan was dried in an oven at 30°C for 24-48 hours [33]. The chitosan concentration was expressed in g/L.

3.3 Total Carbon and Nitrogen determinate

From the cultivation medium of the experimental design with the highest biomass and chitosan produced, chemical analyzes were performed for the concentrations of organic carbon and total nitrogen consumed by *C. elegans* and the remainder in the culture. The percentage of carbon calculated by the volumetric method was evaluated by potassium dichromate and titration with ferrous sulphate. This method consists of oxidizing organic carbon contained in a given volume of sample with 0.1 N solution of potassium dichromate in an acidic medium, followed by titrating the excess dichromate solution with 0.05 N ammonium ferrous sulfate, using (? apagar: if) ferroín solution as an indicator [34].

To determine total nitrogen, the classical Kjeldahl method was used which comprises two steps: (1) digestion of the sample to convert organic nitrogen into the ammonium ion (NH₄-N) and (2) determination of the digested N-NH₄, alkali after distillation. Ammonium sulfate resulting from the digestion is heated with a base, thus releasing ammonia (NH₃), and the reaction can be represented by the equation: NH₄ OH- H₂ O ⇌ NH₃. Ammonia is collected in an acidic solution, and the species N-NH₄ determined by colorimetry, ion selective electrode or titration with standard acid solution [35].

3.4 Determination of pH

After culture the cell-free metabolic liquid was subjected to determination of pH by potentiometry. All experiments were performed in triplicate.

3.5 Methodologies for physical-chemical characterization of chitosan

Infra-red spectroscopy – IRS : Two milligrams (2mg) of chitosan sample previously dried at 60°C under reduced pressure were used and homogenized with 100mg of potassium bromide (KBr). The potassium bromide discs prepared were dried for 24h at 110°C under pressure. The infrared ray spectra were performed using a spectrophotometer Fourier transform (FTIR), Bruker IFS Mod. Potassium bromide discs were used as a reference. The intensity of the bands of maximum absorption was determined by the baseline method. The degree of deacetylation (DA%) was determined as per the methodology described by [15] on applying the following equation:

$$[DD\% = (A_{1655}/A_{3450}) \cdot 100/1] \quad (1)$$

Crystallinity index: The X-ray diffractograms of chitosan was obtained in the X-Ray Laboratory of the Physics Department – Federal University of Pernambuco -UFPE. The measurement was taken using X-ray equipment SIEMENS Model 5000 D, Cu K α radiation with $\lambda = 1.542 \text{ \AA}$, in a scanning range between 4° and 50° with a rate of 0.02 $^{\circ}\text{min}^{-1}$. The interplanar distance was determined by the half height width of the peak of greatest intensity (I_C). The crystallinity index (I_{CR}) was determined with the following equation:

$$[\% = I_{CR} (I_C - I_A / I_C) \times 100] \quad (2)$$

thus: I_C and I_A are the intensities of the signals from the crystalline ($2\theta=20^\circ$) and amorphous ($2\theta=12^\circ$) regions.

3.6 Factorial design

The validation of the biopolymer chitosan production and checking the influence of carbon source and nitrogen on the mycelial growth of *C. elegans*, were performed by Pareto diagrams. The data obtained from the experiments were subjected to statistical analysis by STATISTIC software version 7.0 StatSoft Inc., USA. A full factorial design of 2^3 was carried out to analyze the main effects and interactions of varying concentrations of asparagine, sucrose and corn steep liquor on the response variable biomass and chitosan production. A factorial design 2^3 for biomass and chitosan production by *Cunninghamella elegans* was: % Asparagine: -1 (0) 0 (0.025) 1 (0.05); % Sucrose: 1 (0.1) 0 (0.15) 1 (0.2); % corn steep liquor: 1 (0.3) 0 (0.45) 1 (6).

4. Conclusions

Biomass and chitosan production by *C. elegans* through fermentation process was made possible under the conditions studied here: identifying the main effects and interactions that were produced by the carbon and nitrogen sources present in the low cost medium formulation. The corn steep liquor proved to be the only independent variable that significantly influences the simultaneous increase of the carbon and nitrogen concentrations on the culture medium studied, possibly due to the presence of various essential amino acid compositions. Therefore, the byproduct was formed in the ratio of 2:6 of Carbon: Nitrogen in the medium (sucrose, asparagine, corn steep liquor). The best condition presents high production and physical-chemical characteristics that are important to ensure the condition of a biopolymer promising for several applications.

Acknowledgments

This work was supported by the Foundation for Science and Technology of the Pernambuco State (FACEPE), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. The authors are grateful to the Research Center in Environmental Sciences (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco, Brazil, for the use of their laboratories.

References

1. Campana-Filho, S.P.; Britto, D., Curti, E.; Abreu, F.R.; Cardoso, M.B.; Battisti, M.V.; Sim, P.C.; Goy, R.C.; Signini, R.; Lavall, R.L. Extração, estruturas e propriedades de alfa e beta-quitina. *Quím. Nova.* **2007**, *30*, 644-650.
2. Kleekayai, T.; Suntornsuk, W. Production and characterization of chitosan obtained from *Rhizopus oryzae* grown on potato chip processing waste. *W. J. Microbiol. and Biotechnol.* **2011**, *27*, 1145-1154.
3. Sun, L.; Huang, H.H.; Liu, L.; Zhong, D.F. Transformation of Verapamil by *Cunninghamella blakesleana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, *5*, 2722-2727.
4. Amadio, J.; Murphy, C. D. Biotransformation of fluorobiphenyl by *Cunninghamella elegans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 345-351.
5. Bernat, P. and Dlugonski, J. Degradation of tributyltin by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*, with involvement of cytochrome P-450. *Biotechnol. Letters*, **2002**, *24*, 1971-1974.
6. Bernat, P.; Rafal, S.; Mariusz, K.; Jerzy, D. Butytins degradation by *C. elegans* and *Cochliobolus lunatus* co-culture. *J. Hazard Mater.* **2013**, *15*; 246-247.

7. Lima, R.A.; Andrade, R.F.S.; Santos, L.Q.; Campos-Takaki, G.M; Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado de petróleo. *Exacta*. **2010**, 8, 201-210.
8. Lima e Silva, T.A.; Luna, J.M.; Moraes Filho, M.A.; Campos-Takaki, G.M. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. *Exacta*. **2010**, 8, 19-26.
9. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.; Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *J. Surfact. Deterg.* **1999**, 2:237-242.
10. Amorim, S. R. V.; Pedrosa, R. P.; Fukushima, K.; Martínez, C. R.; Ledingham, W. M.; Campos-Takaki, G. M. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. *Food Technol. Biotechnol.*, **2006**, 44, 519- 534.
11. Freitas, S.M.C.; Stamford, T.C.M.; Franco, L.O.; Campos-Takaki, G.M. Effect of salinity and glucose on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans*. *Asian Chitin J.* **2006**, 2, 29-38.
12. Stamford, T. C. M. et al. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, 10, 61-68.
13. Cardoso, A.; Marques, S.A.; Marinho, P.H.C.; Shiosaki, R.K.; Campos-Takaki, G.M. Influence of the heavy metal on chitosan production by *Absidia corymbifera* UCP 0134. In: *Microorganisms in Industry and Environment*, Mendez-Vilas A (ed) : Lisbon, 2010, pp. 176-180.
14. Silva, T. A., Tambourgi, E. B., Campos Takaki, G. M. Inorganic polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans* (UCP 542) and its influence in the decolorization of textile azo dye Orange II. *Clean. Technol. Environ. Polic.*, **2013**, v.1-6.
15. Roberts, G.A.F. Chitin chemistry. London: MacMillan Press. 1992.
16. Jaworska, M.M.; Konieczna, E. The influence of supplemental components in nutrient medium on chitosan formation by the fungus *Absidia orchidis*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 56, 220-224
17. Cardoso, A. Chitin and chitosan: versatile polysaccharides produced by *Rhizopus arrhizus*. *Asian Chitin J.* **2008**, 4, 1-8.
18. Obayori O.S; Adebusoye, S.A.; Ilori, M.O.; Oyetibo, G.O.; Omotayo, A.E; Amund, O.O. Effects of corn steep liquor on growth rate and pyrene degradation by *Pseudomonas* strains. *Curr Microbiol.* **2010**, 60, 407-411.
19. Batista, A.C.L.; Cardoso, A.; Santos, E.; Freitas, S.M.C.; Alves, S.C.A.; Campos-Takaki, G.M Influence of simultaneous factors on chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* (UCP/WFCC 0148) in corn steep liquor culture media. *Asian Chitin J.* **2011**, 7, 63-67.
20. Cardoso, A.; Lins, C.I.; Santos, E.R.; Freitas, S.M.C.; Campos-Takaki, G.M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules.* **2012**, 27 4904-4914.

21. Merzendorfer, H. Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **2006**, 176(1), 1-15.
22. Chaves, J.A.P.; Bezerra, C.W.B.; Silva, H.A.S.; Santana, S.A.A.; Caracterização e aplicação do biopolímero quitosana como removedor de corante têxtil presente em meio aquoso. *Cadernos de Pesquisas*. **2009**, 16, 36-43.
23. Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N.A.A.Q. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Scienc. Nutrit.*, **2003**, 43, 145-171.
24. Campos-Takaki, G.M. The versatility on copolymers chitin and chitosan production. In Dutta PK (Org.). *Chitin and chitosan opportunities and challenges*. India. 2005
25. Park, J.P.; Kim, S.W.; Hwang, H.J.; Yun, J.W. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exobiopolymer production by *Cordyceps militares*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2001**, 33: 76-84.
26. Jaworska, M.; Sakurai K, Gaudon, P. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. *Polymers Internat.* **2003**, 52, 198-205.
27. Guerra-Sánchez, M.G.; Vega-Pérez, J.; Velázquez-Del, Valle M.G.; Hernández-Lauzardo, N.A. Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* by effect of chitosan with different molecular weights. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2009**, 93, 18-22.
28. Imai, T.; Watanabe, T.; Yui, T.; Sugiyama, J. The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. *Journal. Biochem..* **2003**, 374, 755-760.
29. Kafetzopoulos, D.; Aggeliki Martinou, A.; Bouriotis, V. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1993**, 90, 2564-2568.
30. Bento, R. A.; Stamford, T. L.; Campos-Takaki, G. M.; Stamford, T.; Souza, E. L. D. Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. *Brazilian. Journal. Microbiology.*, **2009**, 40, 583-589.
31. Streit, F., Koch, F., Laranjeira, M., & Ninow, J. L. Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009, 40(1), 20-25.
32. Silva, A.M. Produção de Quitosana por *Absidia corymbifera* em Meio de Baixo Custo e Aplicação na Descoloração de Efluente Industrial. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Pernambuco, 2010.
33. Ninow, J. L. Production of fungal chitosan in liquid cultivation using apple pomace as substrate. *Brazil. J. Microbiol.*, **2009**, 40, 20-25.
34. Hu, K.J.; Hu, J.L.; Ho, K.P. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydr. Polymers.* **2004**, 58, 45-56
35. Baumgarten, M. G. Z.; Rocha, J. M. B.; Niencheski, L. F. H. Manual de análises em oceanografia

química. Rio Grande: Editora da FURG, 1996. 132p.

36. Yasuhara T., Nokihara K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4581-4583.

ANEXO C – NORMAS DA REVISTA MOLECULES(artigo 1)

Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Title of the Paper

Firstname Lastname ^{1,*}, Firstname Lastname ² and Firstname Lastname ²

¹ Full Affiliation, Address; E-Mail: author1@email

² Full Affiliation, Address; E-Mails: author2@email (F.L.); author3@email (F.L.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: author@email;
Tel.: +1-111-111-111; Fax: +1-111-111-112.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: This is the abstract section. One paragraph only (Maximum 200 words).

Keywords: keyword; keyword; keyword (3-10 keywords separated by semi colons)

1. Introduction

Main text paragraph
Main text paragraph

2. Results and Discussion

Main text paragraph
Main text paragraph

[add an equation here; use MS Word or MathType equation function] (1)

(Note: all equations should be completed within a two column table with one line, centered, no borders, as example see above).

Main text paragraph
Main text paragraph

2.1. This Is Subsection Heading

Main text paragraph
Main text paragraph

2.1.1. This Is Subsection Heading

Main text paragraph

Main text paragraph

Table 1. Add a descriptive label of the table here.

[add the table here; use MS Word's table function]

Figure 1. (a) Add a descriptive label of the figure here. (b) Add a descriptive label of the figure here. (c) Add a descriptive label of the figure here.

[add the figure here]

3. Experimental Section

Main text paragraph

Main text paragraph

4. Conclusions

Main text paragraph

Main text paragraph

Acknowledgments

Main text paragraph

References and Notes

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the cited article. *Journal Abbreviation* **2007**, *6*, 100–110.
2. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, Editor 2, Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
3. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196.
4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Journal Abbreviation*, phrase indicating stage of publication (submitted or in press).
5. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds.(if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).
6. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name*, Year, Volume, (Page range), DOI or other identification number. Available online: URL (accessed on Day Month Year).
8. Author if any. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Reference list: We recommend the use of reference management software to prepare the references list (e.g. Endnote, <http://www.mdpi.com/files/word-templates/MDPI.ens>).

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

ANEXO D – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

ANEXO E – NORMAS DO JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS (artigo 2)



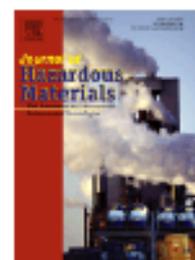
JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS

Environmental Control, Risk Assessment, Impact and Management

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0304-3894

DESCRIPTION

The *Journal of Hazardous Materials* publishes full length research papers, reviews, and case studies which improve our understanding of the **hazards** and **risks** certain **materials** pose to people and the environment or deal with ways of controlling these hazards and associated risks. The **Editors** particularly welcome proposals for review articles. To limit the scope the following areas are excluded: standard municipal and waste and wastewater treatment processes; manufacturing of explosives.

The Journal publishes high-impact contributions on: Characterization of the harmful effects of **chemicals** and materials Measurement and Monitoring of **Hazardous Materials** Transport and Fate of HM in Environment Risk Assessment and Management Physico-chemical and Separation Processes Adsorption Ion Exchange Coagulation/Flocculation/ Precipitation Membrane Processes Flotation Stabilization/Solidification Biological Processes Biodegradation Phytoremediation Advanced Oxidation Processes Photodegradation/Photocatalysis H₂O₂ Fenton Ozone Sonolysis Plasma Processes Safer and Cleaner Technologies The Journal publishes papers with significant novelty and scientific impact. The Editors reserve the right to decline, without external review, papers that do not meet these criteria, including papers that: Are very similar to previous publications, with changed target substrates, employed materials, analyzed sites or experimental methods, Deal with parameter optimization of known processes without new concepts and/or interpretations, Report the environmental analysis and monitoring of specific geographic areas without presenting new insights and/or hypothesis testing, or Do not focus on the environmental relevance and significance of the studied systems or materials.

AUDIENCE

Chemists, Chemical Engineers, Manufacturers of Chemicals, Designers of Chemical Plants, Local Authorities, Emergency Services, Transportation Services, Safety Engineers and Inspectors.

IMPACT FACTOR

2011: 4.173 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

ABSTRACTING AND INDEXING

ASM
 Applied Science & Technology Abstracts
 CIS
 Cambridge Scientific Abstracts
 Centre de Documentation Scientifique et Technique - PASCAL Database
 Chemical Abstracts
 Coal Abstracts
 Current Contents/Engineering, Computing & Technology
 EMBASE
 Elsevier BIOBASE
 Engineering Index
 Environmental Periodicals Bibliography
 Laboratory Hazards Bulletin/Chemical Hazards in Industry
 NIOSHTIC
 Scopus
 Système de Documentation et Information Métallurgique

EDITORIAL BOARD

Editors:

Diana Aga, State University of New York (SUNY) at Buffalo, Buffalo, NY, USA, **Email:** dianaaga@buffalo.edu
Wonyong Choi, Pohang University of Science and Technology, Pohang, South Korea, **Email:** wchoi@postech.ac.kr
Andrew Daugulis, Queen's University, Kingston, ON, Canada, **Email:** hazmat@chee.queensu.ca
Gianluca Li Puma, Loughborough University, Loughborough, UK, **Email:** g.li.puma@lboro.ac.uk
Gerasimos Lyberatos, National Technical University of Athens (NTUA), Athens, Greece, **Email:** lyberatos@chemeng.ntua.gr
Joo Hwa Tay, Nanyang Technological University, Singapore, Singapore, **Email:** cjhtay@ntu.edu.sg

Associate Editor:

Jaesang Lee, Korea Institute of Science and Technology (KIST), Seoul, South Korea, **Email:** lee39@kist.re.kr
Constantina Marazioti, University of Patras, Patras, Greece, **Email:** nadia@chemeng.upatras.gr

Editorial Board:

R. Andreozzi, Napoli, Italy
J. Baeyens, Tremelo, Belgium
A. Ballester, Madrid, Spain
E. Brillas, Barcelona, Spain
H. Cheng, Guangzhou, China
V. Cozzani, Bologna, Italy
G. de la Rosa, Guanajuato, Gto., Mexico
D. Dionysiou, Cincinnati, OH, USA
M. Erdem, Elazig, Turkey
S. Esplugas, Barcelona, Spain
M. Fingas, Edmonton, AB, Canada
Z.P. Hao,
W. Lee, Yuseong-gu, Daejeon, South Korea
W.-J. Lee, Tainan, Taiwan, ROC
P. Lianos, Patras, Greece
E.C. Lima, Porto Alegre, Brazil
M Litter, Prov. de Buenos Aires, Argentina
L.Q. Ma, Gainesville, FL, USA
T. Mangialardi, Roma, Italy
D. Mohan, New Delhi, India
C. Mulligan, Montreal, QC, Canada
J.M. Park, Pohang, South Korea
H.J. Pasman, Delft, Netherlands
G. Pavlostathis, Atlanta, GA, USA
M.J. Plewa, Urbana, IL, USA
H. Potgieter, WITS, South Africa
P. Randall, Cincinnati, OH, USA
S.D. Richardson, Athens, GA, USA

P. Stepnowski, Gdansk, Poland
M.B. Talawar, The Hague, Netherlands
S. Tunali Akar, Meselik/Eskisehir, Turkey
S.-B. Wang, Perth, WA, Australia
H.-Q. Yu, Anhui, China
J. Yu, Wuhan, China
S. Zeman, Pardubice, Czech Republic
A.I. Zouboulis, Thessaloniki, Greece

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *Journal of Hazardous Materials* publishes full length research papers, reviews, and case studies which improve our understanding of the hazards and risks certain materials pose to people and the environment or deal with ways of controlling these hazards and associated risks. The Editors particularly welcome proposals for review articles. To limit the scope the following areas are excluded: work place health & safety and non-hazardous materials waste.

The Journal publishes high-impact contributions on:
Characterization of the harmful effects of hazardous materials
Impact assessment methods and models - acute and chronic effects of hazardous chemical releases
Risk assessment and management
Pollution control processes
Inherently safer and cleaner technologies
Treatment and disposal of solid, liquid and gaseous hazardous waste
Remediation of contaminated soil and groundwater

The Journal publishes papers with significant novelty and scientific impact. The Editors reserve the right to decline, without external review, papers that do not meet these criteria, including papers that: Are very similar to previous publications, with changed target substrates, employed materials, analyzed sites or experimental methods, Deal with parameter optimization of known processes without new concepts and/or interpretations, Report the environmental analysis and monitoring of specific geographic areas without presenting new insights and/or hypothesis testing, or Do not focus on the environmental relevance and significance of the studied systems or materials.

A 100 word (maximum) "statement of novelty" explaining why the work should be published in *Journal of Hazardous Materials* must be provided as a separate document upon submission of your manuscript. The "statement of novelty" must not be a retelling of the abstract. When preparing the statement please make sure to address (a) the significance and novelty of the work, with respect to existing literature, and (b) the scientific impact and interests to our readership. Papers that lack significant novelty will be rejected.

Types of Paper

Research papers are not to be submitted in two parts (i.e. Part I and Part II) - these must be consolidated into one manuscript.

The Editors welcome proposals for review articles. Proposals must contain the following three components for consideration: (1) brief summary of the proposed review article content, (2) brief description of the author's academic background and research areas, and (3) a list of Authors' publications related with the proposed review article topic. Please send your proposals to one of the Editors directly using the e-mail addresses available on the Journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/hazmat>. Note that submission of review articles is by invitation only, pending approval of the proposal by the Editors.

Letters to the Editor will undergo review. Any letters to the editors received will be circulated to all editors before a decision is made whether to publish. Authors will also be given an opportunity to respond.

To ensure conciseness, follow these maximum word count guidelines: regular paper: 5,000 words; review article: 15,000 words. Cover letters must state the manuscript word count, which includes text, figures captions, and table legends, but not references.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of \$3000 applies (for further information on open access see <http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options>). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://ees.elsevier.com/hazmat/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

Manuscripts must conform to the following guidelines for revised manuscripts or they will be rejected.

Should Authors be requested by the Editor to revise their submission, the revised version should be submitted within **two months**. Please note that revised manuscripts will be sent out for review because revising a manuscript does not automatically mean it will be accepted for publication.

In the revision letter, authors must transcribe each reviewer's comments into the letter, followed by the author's responses. Any associated changes in the manuscript (including page and line number) must be copied down in the revision letter. This will help the Editor compare the reviewer comments with both the replies and the changes made in the manuscript. The replies to the reviewers' comments must also be reflected in the revised manuscript wherever possible (not just in the revision letter). Authors must give clear reasons if they choose not to make changes according to the reviewer suggestions. In the revised manuscript, authors must indicate how the manuscript was changed according to the reviewer comments by highlighting the revisions (all new text/data/figures) with colour. Only one final revised version the manuscript must be uploaded.

Authors must provide the original manuscript number, the name of the original handling Editor, and state whether the revised manuscript is a resubmission of a rejected manuscript both in EES and in the cover letter in order to ensure that it is assigned to the original handling Editor.

Upon resubmission of a rejected manuscript, Authors will be required to upload the decision letter from the Editor requesting submission of the rejected manuscript, the original Reviewer comments of the rejected manuscript, the responses to the Reviewer comments, and the original manuscript number. The resubmitted manuscript must indicate, in color, where the revisions were made in the paper in response to the Reviewer comments.

Please be aware that manuscripts rejected for "out of scope" or "lack of novelty" will not be accepted as a resubmission.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **The submitting author and the corresponding author must be the same person. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required (100-200 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) <http://www.iupac.org/> for further information.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numerals. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

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

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

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

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Manuscripts must contain at least 10 references. The references must cite recent and relevant research only. At least half (50%) of the references should be published within the last 10 years.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the

journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should

submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO F – NORMAS DO OPEN ACCESS - INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH

Int. J. Environ. Res. Public Health **2013**, *10*, 1–x manuscripts; doi:10.3390/ijerph100x000x

OPEN ACCESS

International Journal of
**Environmental Research and
Public Health**
ISSN 1660-4601
www.mdpi.com/journal/ijerph

Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Title of the Paper

Firstname Lastname ^{1,*}, Firstname Lastname ^{2,†}, Firstname Lastname ^{2,†} and
Firstname Lastname ³

¹ Full Affiliation, Address

² Full Affiliation, Address; E-Mails: author2@email (F.L.); author3@email (F.L.)

³ Full Affiliation, Address; E-Mail: author4@email

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: author1@email;
Tel.: +1-111-111-111 (ext. 123); Fax: +1-111-111-112.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: This is the abstract section. One paragraph only (Maximum 200 words).

Keywords: keyword; keyword; keyword (3–10 keywords separated by semi colons)

1. Introduction

Main text paragraph.

Main text paragraph.

2. Experimental Section

Main text paragraph.

Main text paragraph.

3. Results and Discussion

Main text paragraph.

Main text paragraph.

[add an equation here; use MS Word or MathType equation function] (1)

(Note: all equations should be completed within a two column table with one line, centered, no borders, as example see above).

Main text paragraph.

Main text paragraph.

3.1. This Is Subsection Heading

Main text paragraph.

Main text paragraph.

3.1.1. This Is Subsection Heading

Main text paragraph.

Main text paragraph.

Table 1. Add a descriptive label of the table here.

[add the table here; use MS Word's table function]

Figure 1. (a) Add a descriptive label of the figure here. (b) Add a descriptive label of the figure here. (c) Add a descriptive label of the figure here.

[add the figure here]

4. Conclusions

Main text paragraph.

Main text paragraph.

Acknowledgments

Main text paragraph.

Conflict of Interest

State any potential conflicts of interest here or “The authors declare no conflict of interest”.

References and Notes

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the cited article. *Journal Title* **2007**, *6*, 100–110.
2. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, Editor 2, Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
3. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196.

4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. Journal Abbreviation, phrase indicating stage of publication.
5. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).
6. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name*, Year, Volume, (Page range), doi or other identification number. Available online: URL (accessed on Day Month Year).
8. Title of Site. URL (accessed on Day Month Year).

Reference list: We recommend the use of reference management software to prepare the references list (e.g., Endnote, <http://www.mdpi.com/files/word-templates/MDPI.ens>).

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Produção de biomassa e quitosana por *C. elegans* UCP/WFCC 0542 ...

Produção de biomassa e quitosana por *Cunninghamella elegans* ucp/wfcc 0542 e aplicação na remoção de cromo/ Ednaldo Ramos dos Santos , Recife: O autor, 2013.

149 folhas