



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E**  
**BIOPROCESSOS**  
**CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**CATARINA BUSON DE OLIVEIRA MUNIZ**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE QUITOSANA NA POROSIDADE E**  
**RESISTÊNCIA DE MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA PARA**  
**IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS E POSTERIOR USO NO**  
**TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

**SUMÉ-PB**

**2018**

**CATARINA BUSON DE OLIVEIRA MUNIZ**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE QUITOSANA NA POROSIDADE E  
RESISTÊNCIA DE MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA PARA  
IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS E POSTERIOR USO NO  
TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado como exigência para obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia de  
Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade  
Federal de Campina Grande – UFCG.

**Orientador: Professor Dr. Aldre Jorge Morais Barros**

**SUMÉ-PB**

**2018**

M966a Muniz, Catarina Buson de Oliveira.

Avaliação da influência de quitosana na porosidade e resistência de microesferas de alginato/quitosana para imobilização de biomassa para posterior uso no tratamento de águas residuárias. / Catarina Buson de Oliveira Muniz. - Sumé - PB: [s.n], 2018.

46 f.

Orientador: Prof. Dr. Aldre Jorge Morais Barros.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Recursos hídricos. 2. Resíduo poluidor. 3. Quitosana. I. Título.

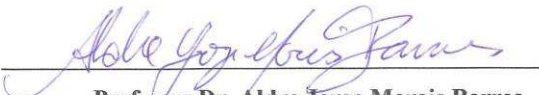
CDU: 628.1 (043.1)


CATARINA BUSON DE OLIVEIRA MUNIZ

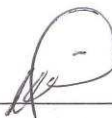
**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE QUITOSANA NA POROSIDADE E  
RESISTÊNCIA DE MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA PARA  
IMOBILIZAÇÃO DE BIOMASSA PARA POSTERIOR USO NO TRATAMENTO DE  
ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado como exigência para obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia de  
Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade  
Federal de Campina Grande – UFCG.

**BANCA EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Dr. Aldre Jorge Morais Barros**  
(Orientador – UAEB/UFCG)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. José Nilton Silva**  
(Examinador Interno – UAEB/UFCG)

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Valderi Duarte Leite**  
(Examinador Externo -DESA/UEPB)

Aprovado em: 22 de março de 2018.

*Dedico este trabalho ao meu pai e mãe por  
percorrerem esse longo caminho ao meu  
lado.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus quando pôs seu fôlego de vida em mim para questionar realidades e propor um novo mundo de possibilidades.

Gratidão imensurável ao meu pai Célio, minha mãe Vaneide, e meu irmão João Lucas, que participaram desse sonho comigo, me encorajaram a vivê-lo e me deram forças para continuar nos momentos que eu tentei desistir, amo vocês mais que tudo nessa vida.

A toda minha família, que de alguma forma fez parte dessa história, em especial a minha tia Celli por me ajudar com a pesquisa.

Ao meu namorado Pedro, por mesmo distante se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos que a universidade me deu, Darlyson, Laura, Caio, Felipe, Canígia, Mônica e Jéssyca, vocês fazem parte dessa caminhada, pois tornaram todos os momentos mais difíceis melhores de alguma forma. Meu eterno QG.

Aos meus irmãos de alma Elder e Jéssica com quem dividi meus dias bons e ruins, minhas risadas e lágrimas. Deus coloca as pessoas certas no meu caminho, sempre.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, em especial ao professor Aldre pela orientação, comprometimento e atenção sempre que precisei, e ao professor Eloy por ter se tornado um grande amigo.

Ao professor Valderi pelas inúmeras colaborações, pela paciência diária e pelas palavras certas ditas no momento certo.

À professora Célia por dividir comigo um pouco da sua sabedoria e conhecimento.

Ao Vanderley pelas incontáveis vezes que me prestou ajuda, sempre de bom grado.

*“O dinheiro faz homens ricos, o conhecimento  
faz homens sábios e a humildade faz grandes  
homens”. Mahatma Gandhi*

## RESUMO

O intenso processo de crescimento populacional tem provocado grande pressão sobre os recursos hídricos devido à geração de quantidades cada vez maiores de resíduos com elevado potencial poluidor. A quitosana, polímero natural obtido a partir da desacetilação da quitina vem sendo bastante utilizada pela sua capacidade formadora de gel, não toxicidade e estabilidade física no tratamento de efluentes tanto para a imobilização de células com capacidade biorremediadora quanto para adsorção de componentes presentes em águas residuais. O objetivo do presente estudo é avaliar a influência de diferentes concentrações de quitosana em esferas de alginato/quitosana nas seguintes proporções: 4:1, 1:2 e 4:3 (m/m). Para tanto, foram avaliados a morfologia das esferas e porosidade através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), grau de intumescimento e perda de massa para esferas imersas, separadamente, em água destilada e esgoto. As esferas contendo 3% de quitosana apresentaram melhores resultados no que diz respeito à manutenção do formato esférico e menor diâmetro, bem como a presença de rugosidades o que aumenta consideravelmente a área superficial de adsorção e/ou absorção, maior grau de intumescimento para os dois tipos de imersões, chegando a um valor máximo de 750% em água destilada e 413% em esgoto. Em relação à perda de massa, esferas a 3% de quitosana demonstraram menor degradação no tempo de 7 dias, sendo 46,49% para as imersas em água destilada e 51,70% em esgoto.

**PALAVRAS-CHAVE:** Quitosana. Imobilização celular. Esferas. Biorremediação.



## ABSTRACT

The intense process of population growth has put great pressure on water resources due to the generation of increasing amounts of waste with high polluting potential. Chitosan, a natural polymer obtained from the deacetylation of chitin, has been widely used for its gel-forming capacity, non-toxicity and physical stability in the treatment of effluents both for the immobilization of cells with bioremediation capacity and for adsorption of components present in waste water. The aim of the present study is to evaluate the influence of different chitosan concentrations on alginate / chitosan beads in the following proportions: 4: 1, 1: 2 and 4: 3 (m / m). In order to do so, the morphology of the spheres and porosity by Scanning Electron Microscopy (SEM), degree of swelling and loss of mass for spheres immersed separately in distilled water and sewage were evaluated. The spheres containing 3% of chitosan presented better results in terms of spherical shape maintenance and smaller diameter, as well as the presence of roughness, which considerably increases the surface area of adsorption and / or absorption, a higher degree of swelling for both types of immersion, reaching a maximum value of 750% in distilled water and 413% in sewage. In relation to the loss of mass, 3% chitosan spheres showed lower degradation in the time of 7 days, being 46.49% for those immersed in distilled water and 51.70% in sewage.

**KEY WORDS:** Chitosan. Cell immobilization. Spheres. Bioremediation.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução do número de pesquisas científicas relacionadas à IC publicadas nos últimos 50 anos.....	17
Figura 2 - Microesferas de quitosana de tamanhos variados.....	22
Figura 3 - Estrutura química do alginato.....	24
Figura 4 - Comparação das estruturas moleculares de quitosana, quitina e celulose.....	25
Figura 5 - Fotografia de esferas de alginato/quitosana econtendo diferentes concentrações de quitosana de alginato/quitosana .....	31
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura das esferas de alginato/quitosana após secagem com diferentes concentrações de quitosana.....	33
Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície das esferas com diferentes concentrações de quitosana .....	34
Figura 8 - Gráfico do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 1% de quitosana imersas em água destilada.....	35
Figura 9 - Gráfico da variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 2% de quitosana imersas em água destilada.....	36
Figura 10 - Gráfico da variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 3% de quitosana imersas em água destilada.....	36
Figura 11 - Gráfico da variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 1% de quitosana imersas em esgoto.....	37
Figura 12 - Gráfico da variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 2% de quitosana imersas em esgoto.....	38
Figura 13 - Gráfico da variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 3% de quitosana imersas em esgoto.....	38
Figura 14 - Microscopia eletrônica de esferas contendo diferentes concentrações de quitosana intumescidas em água destilada.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações de microrganismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos.....	18
Tabela 2 - Utilização de células imobilizadas na biodegradação de compostos tóxicos.....	19
Tabela 3 - Vantagens do uso de células imobilizadas sobre as células livres.....	20
Tabela 4 - Diâmetro médio das esferas de alginato/quitosana com diferentes concentrações de quitosana.....	32
Tabela 5 - Dados de biodegradação para as esferas com concentração de 1% em quitosana, imersas em água destilada e esgoto.....	40
Tabela 6 - Tabela 5 - Dados de biodegradação para as esferas com concentração de 2% em quitosana, imersas em água destilada e esgoto.....	40
Tabela 6 - Tabela 5 - Dados de biodegradação para as esferas com concentração de 3% em quitosana, imersas em água destilada e esgoto.....	40

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EXTRABES	Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgoto Sanitário
g	Gramas
h	Horas
IC	Imobilização Celular
kg	Quilograma
L	Litros
m	Massa
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro
pH	Potencial Hidrogninico
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>17</b>
3.1 RESÍDUOS SÓLIDOS: UM PROBLEMA AMBIENTAL.....	17
3.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO EM LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO.....	18
3.3 A BIOTECNOLOGIA E OS SISTEMAS IMOBILIZADOS.....	19
3.4 IC: MÉTODO DE APRISIONAMENTO EM GEL NA FORMA DE ESFERAS.....	22
3.5 A TECNOLOGIA DA IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO ADICIONADA DE QUITOSANA.....	24
3.6 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO E POROSIDADE NA DIFUSÃO DE MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA.....	27
<b>4 MATEROAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS .....	33
5.2 ANÁLISES DA MORFOLOGIA E POROSIDADE DAS MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	34
5.3 GRAU DE INTUMESCIMENTO .....	36
5.4 PERDA DE MASSA DAS ESFERAS.....	41
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diante da crescente geração de resíduos e consequente preocupação global sobre a questão, é notória a demanda científica mundial de desenvolvimento de tecnologias alternativas para o tratamento de efluentes visando o reuso de águas residuárias. A biotecnologia surge no âmbito científico para auxiliar na busca por alternativas viáveis que reduzam ao máximo o impacto ambiental gerado pelo homem no meio ambiente, utilizando-se para tal dos microrganismos como ferramenta principal. Partindo desse princípio, a técnica de aprisionamento em gel vem ganhando espaço nos mais diversos segmentos industriais, mas principalmente no que diz respeito à imobilização de microrganismos em bioprocessos como a fabricação de fármacos, produção de enzimas, fermentação de mostos, reações de biotransformação e biodegradação, dentre inúmeros outros (COVIZZI, 2007).

O lixiviado, composto resultante da decomposição da matéria orgânica do lixo, quando em contato com a água da chuva apresenta grande potencial poluidor de corpos hídricos superficiais e subterrâneos (KJELDSEN; CHRISTOPHERSEN, 2001), o que se dá devido as suas elevadas concentrações de compostos orgânicos, amônia e sais inorgânicos, podendo incluir também metais pesados (GANIGUÉ et al., 2007), além de apresentar baixa biodegradabilidade (LANGE, 2006). Tais condições tornam os métodos convencionais adotados atualmente para tratar o lixiviado, principalmente lagoas de estabilização, ineficientes devido à incapacidade dos microrganismos atuarem de forma eficaz em ambientes de elevada toxicidade. O mecanismo de imobilização celular apresenta inúmeras vantagens ao ser utilizado na biorremediação desses resíduos uma vez que conserva o metabolismo celular devido a sua maior tolerância às altas concentrações de compostos tóxicos, gerando um aumento da produtividade dos processos biológicos envolvidos (GIESE, 2015).

O alginato, polímero já bastante empregado na formação de esferas para tratamento de efluentes apresenta algumas limitações dentre elas a baixa estabilidade destes géis na presença de certos componentes, os quais podem promover rupturas e a dissolução das esferas formadas, a exemplo fosfato e citrato. Este problema pode ser contornado pelo tratamento com quitosana, outro biopolímero, para aumentar a resistência dos biocatalizadores formados (YOO et al. 1996 apud GIESE, 2015).

Uma infinidade de polímeros vem sendo estudada no intuito de aprimorar matrizes utilizadas para compor esferas imobilizadas, dentre elas a quitosana. Polímero natural oriundo do exoesqueleto de inseto e da carapaça de crustáceos, a quitosana apresenta inúmeras

características necessárias para obtenção de sucesso na IC dentre elas: capacidade de formar gel; baixa toxicidade; alta estabilidade; porosidade uniforme. Além disso, através de sua modificação física e/ou química, ou ainda, sua associação a outros materiais, torna-se possível obter melhorias em suas propriedades (CUNHA, 2013).

A adição de quitosana às esferas de alginato tem como objetivo acrescentar características vantajosas da mesma na composição das microesferas para aumento da eficiência nos processos relacionados à biorremediação. O trabalho em questão teve como finalidade avaliar a influência de diferentes concentrações de quitosana na porosidade, intumescimento e degradação de esferas de alginato/quitosana para sua posterior utilização nas técnicas de IC objetivando o tratamento de efluentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O trabalho em questão tem por objetivo geral contribuir para os estudos relacionados ao emprego da quitosana na obtenção de esferas para imobilização celular com potencial utilização no tratamento de efluentes.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Preparar microesferas de alginato/quitosana em diferentes concentrações de quitosana através da técnica de aprisionamento em gel;
- ✓ Caracterizar microesferas de alginato/quitosana contendo diferentes concentrações de quitosana quanto ao grau de intumescimento e biodegradação;
- ✓ Avaliar a morfologia externa e porosidade utilizando-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);



### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 RESÍDUOS SÓLIDOS: UM PROBLEMA AMBIENTAL

Segundo o Art. 3 da Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010 (Política Nacional de Resíduos Sólidos) resíduos sólidos se caracterizam como substâncias resultante de atividades humanas em sociedade cujas características tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção média per capita de resíduos sólidos urbanos para a população brasileira é de 0,74kg. (hab.dia)<sup>-1</sup>. O Ministério do Meio Ambiente garante que implicações da gestão inadequada dos resíduos sólidos no meio ambiente resultam na degradação do solo, comprometimento de mananciais, poluição do ar e na saúde pública (BRASIL, 2000).

Com o objetivo de minimizar possíveis danos ao ambiente e à saúde pública, esses resíduos destinam-se a aterros sanitários, locais construídos sob normas técnicas específicas, onde são confinados com segurança conforme a NBR 8419, norma da ABNT que fixa as condições mínimas exigíveis para a apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos.

Resultante da decomposição da massa orgânica do lixo, o chorume, quando em contato com a água da chuva em aterros gera o lixiviado. Resíduo com grande potencial poluidor, coloca em risco de contaminação águas superficiais e subterrâneas, o que o torna responsável de um dos impactos mais significantes no que diz respeito a deposição de resíduos (KJELDSEN; CHRISTOPHERSEN, 2001). Em corpos hídricos, o acúmulo de nutrientes proveniente do lixiviado reduz a quantidade de oxigênio ali dissolvido, gerando um fenômeno conhecido como eutrofização, no qual a água adquire uma cor turva ocasionando a morte de diversas espécies animais e vegetais.

O lixiviado caracteriza-se por apresentar em sua composição concentrações elevadas de compostos orgânicos, amônia e sais inorgânicos, podendo incluir também metais pesados (GANIGUÉ et al., 2007). Apresenta baixa biodegradabilidade (LANGE, 2006), sendo o tratamento biológico em lagoas de estabilização majoritariamente utilizado devido às condições climáticas favoráveis e disponibilidade de área territorial. Esse tipo de processo pode ser considerado eficiente a primeiro instante, ou seja, no lixiviado de aterro novo, rico

em ácidos graxos voláteis e elevado valor de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). No entanto, com o passar do tempo, surgem inúmeros problemas relacionados ao lixiviado das celas mais antigas passa a apresentar reduzida disponibilidade de matéria orgânica biodegradável, altas concentrações de nitrogênio amoniacal, metais potencialmente tóxicos e substâncias húmicas (OZTURK *et al.*, 2003).

Uma vez que torna-se inviável economicamente a utilização de um único método que reduza todos os parâmetros ambientais relevantes do lixiviado, têm sido propostos métodos físico-químicos e biológicos integrados, de forma a reduzir custos e alavancar a eficiência do processo como um todo.

### 3.2 TRATAMENTO BIOLÓGICO DE LIXIVIADO EM LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO

Para o sucesso do tratamento biológico de resíduos é necessária a presença de uma expressiva microbiota. Nas lagoas de estabilização as bactérias heterotróficas são os principais componentes responsáveis pela estabilização da matéria orgânica. Os protozoários alimentam-se de bactérias, algas e outros microrganismos, sendo essenciais para manutenção do equilíbrio entre os diversos organismos presentes (MARTINS, 2010). Se presentes nas lagoas de estabilização, as algas as servem de indicadores da fertilidade das águas, pela capacidade de sintetizar matéria orgânica, rápido desenvolvimento, multiplicação e desaparecimento (SOLDATELLI e SCHWARZBOLD, 2010).

No entanto, existem duas problemáticas principais relacionadas aos microrganismos no tratamento biológico em lagoas de estabilização: dificuldade no controle da população de microrganismos ali presentes e a necessidade de um tempo relativamente longo para que os mesmos atinjam padrões aceitáveis.

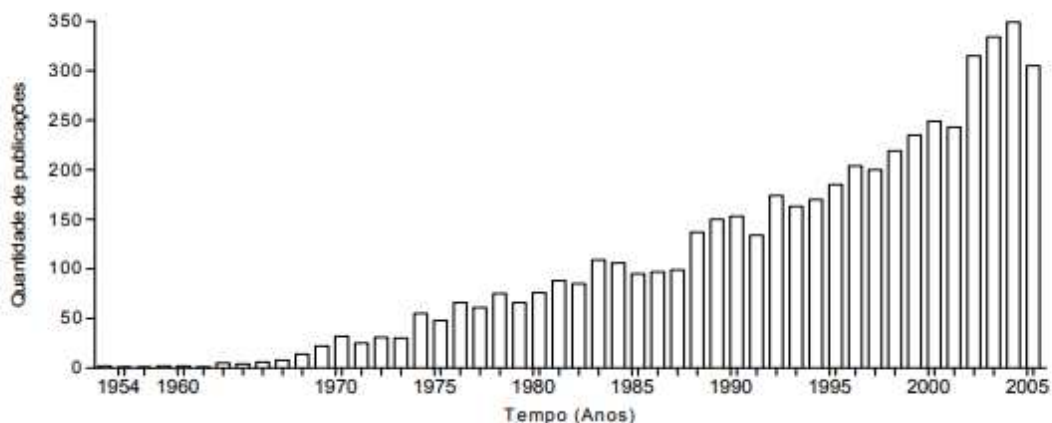
Além disso, a capacidade de degradar compostos tóxicos desses microrganismos é limitada (BUITRON, 1996). Se sujeitos a ambientes demasiadamente adversos com grandes variações de pH, temperatura ou cargas tóxicas, podem ter o metabolismo alterado incapacitando-os assim, de realizar a decomposição almejada, ou ainda, em condições extremas, levá-los à morte. Além disso, dificuldade no controle da população de microrganismos e a necessidade de um tempo relativamente longo para que os efluentes atinjam o volume necessário para início dos processos de degradação (SERAFIM *et al.*, 2003).

Tendo em vista que os processos convencionais de remoção por desinfecção ou diminuição da concentração de patógenos são, em partes, ineficientes, devido a toxicidade dos subprodutos gerados, alguns até mesmo, carcinogênicos, a exemplo dos organoclorados (SUASSUNA, 2001), faz-se necessária o incentivo a pesquisas que encontrem formas mais eficientes no tratamento de resíduos.

### 3.3 A BIOTECNOLOGIA E OS SISTEMAS IMOBILIZADOS

A utilização de microrganismos imobilizados no tratamento de resíduos traz benefícios à medida que possibilita o tratamento de esgotos em menor área, diminuindo os custos de construção da lagoa. A imobilização de células objetiva conservar o metabolismo celular e/ou enzimático com a intenção de aumentar a produtividade dos processos biológicos envolvidos e, conseqüentemente, diminuir os custos das operações em escala laboratorial e, principalmente, industrial (GIESE, 2015). Dentro desse contexto, a biotecnologia surge como ciência multidisciplinar que utiliza como ferramenta os microrganismos na obtenção de produtos, geração de serviços, ou ainda, na otimização daqueles já existentes. Desde então, os processos de imobilização têm alcançado consideráveis avanços no que diz respeito à descoberta de novos materiais para matrizes bem como ao aprimoramento das técnicas de imobilização em si. Tal afirmação pode ser elucidada conforme mostra a Figura 1.

**Figura 1.** Evolução do número de pesquisas científicas relacionadas à IC publicadas nos últimos 50 anos.



FONTE: Web of Science Data Base “on-line”.

Imobilizar células consiste em confinar fisicamente as mesmas em uma região definida de espaço, na qual serão mantidas suas atividades catalíticas possibilitando a reutilização das mesmas, além da possibilidade de se trabalhar com elevada concentração de células, o que permite um aumento considerável no rendimento de processos. (FREEMAN; LILLY, 1998).

Uma das principais vantagens da IC (Imobilização Celular) é o reciclo de células, ou seja, seu reuso, principalmente se a matriz utilizada for um material inerte que apresente resistência mecânica. Tal tecnologia pode ser empregada em diversos segmentos conforme mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Aplicações de microrganismos imobilizados e suportes utilizados em processos biotecnológicos.

Processo	Microrganismo	Suporte Utilizado	Referência
Produção de etanol	<i>S. cerevisiae</i>	bucha vegetal	OGBONNA; MASHIMA, TANAKA, 2001
Fermentação de mostos de uvas	<i>S. cerevisiae</i>	Maçã	KOURKOUTAS et al., 2004
Biotransformação	<i>Rhodococcus</i> sp.	Alginato	GUO et al., 2006
Biodegradação	<i>P. chrysosporium</i>	PUF*, cerâmica, serragem	SHIM; KAWAMOTO, 2002
Produção de enzimas	<i>N. frowardii</i>	PUF	ROGALSKI et al., 2006

\*PUF: fibra de poliuretano. Fonte: COVIZZI, 2007 Modificado.

Atualmente muitas técnicas estão disponíveis para a imobilização de enzimas ou células em uma variedade de suportes naturais e sintéticos. A escolha do suporte, assim como da técnica depende da natureza da enzima/célula, do substrato e de sua aplicação final. (PAULA E SILVA, 2011).

Pode-se classificar as técnicas de IC em dois grupos principais: a) naturais, relacionadas a formação de biofilmes e a adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais, e b) artificiais, as quais compreendem a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes. Nas IC naturais, as ligações ocorrem de forma

espontânea por meio de interações eletrostáticas. Já nas artificiais as células se ligam às matrizes covalentemente através de um agente ligante (COVIZZI, 2007).

Diversos são os trabalhos comprovando a resistência de células imobilizadas a compostos tóxicos e ambientes hostis, fator que tem possibilitado o uso das mesmas na biotransformação dos mais variados compostos, conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Utilização de células imobilizadas na biodegradação de compostos tóxicos.

<b>Composto</b>	<b>Microrganismo imobilizado</b>	<b>Matriz de imobilização</b>	<b>Referência</b>
organoclorados	<i>P. chrysosporium</i>	espuma de poliuretano	SHIM; KAWAMOTO, 2002
o-ftalato	<i>Bacillus sp.</i>	espuma de poliuretano	PATIL et al., 2006
Sulfato	BRS	carvão vegetal	SILVA et al., 2006
hidrocarbonetos policíclicos	<i>P. chrysosporium</i>	suporte sólido	VIGGIANI et al., 2006
Óleo	bactériashalotolerantes	fibras de polipropileno	DIAZ et al., 2001.

FONTE: autor.

O uso de biomassa imobilizada no tratamento de efluentes têm gerado diversos estudos pela sua possibilidade de aplicação na remoção de DQO (demanda química de oxigênio) em reatores anaeróbicos em batelada sequencial (GIESE, 2015). Nesse caso, de acordo com Ratuszne (2001) a IC visa melhorar a retenção de sólidos e a eliminar a etapa de sedimentação, diminuindo significativamente o tempo de operação (apud GIESE, 2015).

No tratamento de águas residuais o método de IC mais adotado tem sido o encapsulamento utilizando polímeros sintéticos, tendo em vista que os naturais apresentam menor estabilidade quando inseridos em ambientes com elevado grau de contaminação. Os polímeros sintéticos também apresentam maior resistência ao rompimento, porém, os polímeros naturais afetam menos o metabolismo da célula imobilizada. (PAULA E SILVA, 2011).

Durante a escolha da matriz ou suporte a ser utilizado é necessário levar em consideração alguns pré-requisitos que os mesmos devem preencher: características fundamentais a fim de tornar o processo o mais eficaz. Algumas delas são: Apresentar porosidade uniforme a fim de permitir trocas gasosas, entrada de substrato e fluxo de cofatores e produtos do metabolismo microbiano (NORTON et al., 1995). Ter boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica (DÍAZ et al., 2001). Ser estável a mudanças drásticas de pressão, temperatura e pH do meio (MOREIRA et al., 1998). Proporcionar imobilização fácil, acessível e viável para uso em escala industrial (FENICE et al., 2000).

### 3.4 IC: MÉTODO DE APRISIONAMENTO EM GEL NA FORMA DE ESFERAS

O aprisionamento em gel é o método mais utilizado para imobilização de células vivas (PRADELLA, 2001). A imobilização celular visa preservar a atividade metabólica e/ou catalítica das células vivas ou enzimas com a intenção de aumentar a produtividade dos bioprocessos envolvidos e de diminuir os custos das operações laboratoriais e, principalmente, industriais.

Uma vez que a matriz de imobilização resulta, geralmente, na maior proteção das células, encontram-se na Tabela 3 algumas vantagens do uso de células imobilizadas sobre as células livres.

**Tabela 3.** Vantagens do uso de células imobilizadas sobre as células livres.

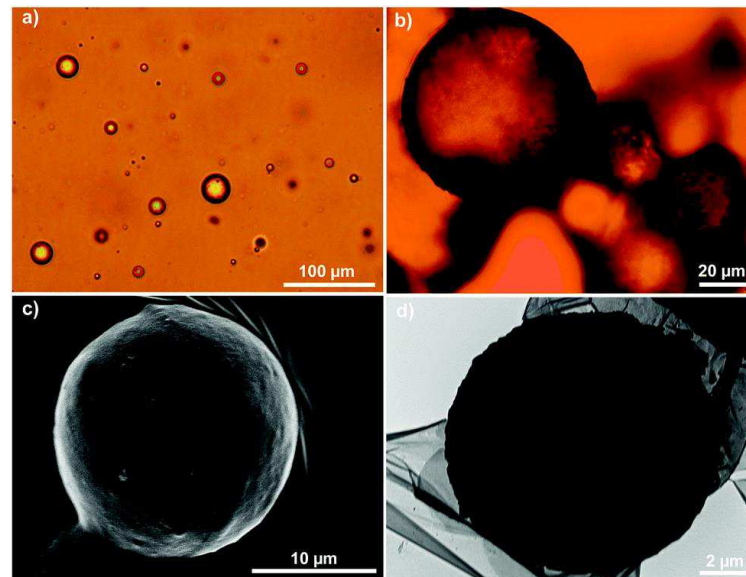
Vantagens
Capacidade de operação na presença de uma maior densidade celular.
Aumento da estabilidade e do tempo de atividade do biocatalisador.
Maior afinidade pelo substrato.
Maior tolerância às altas concentrações de compostos tóxicos

Fonte: (COVIZZI et al. 2007).

Aprisionamento ou microencapsulação, como também pode ser chamado, é um método clássico consiste no confinamento físico de células em uma matriz polimérica formadora de gel. Nessa técnica, as células microbianas são adicionadas a um material polimérico que pode ser de origem sintética como a acrilamida, o poliuretano ou, o gel de álcool polivinílico (PVA-gel), ou natural, como o ágar, o alginato e a quitosana (ver Figura 2). De acordo com Wang et al. (2005) tais polímeros apresentam em sua composição cargas

negativas que quando gotejadas em solução catiônica, o que ocasiona a troca de íons por cátions divalentes, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$ , formando ligações iônicas, o que gera um gel de formato consistente e insolúvel, aprisionando assim, os microrganismos.

**Figura 2:** Confinamento de quitosana solúvel em água em microesferas de quitosana de tamanhos variados.



Fonte: DANG *et al.*, 2017.

Visto que a matriz de aprisionamento geralmente resulta em limitações no que diz respeito a transferência de massa, a imobilização na forma de esferas é preferível devido à elevada área superficial (GROBOILLOT *et al.*, 1994). O tamanho da esfera depende de fatores como a velocidade do fluxo, a densidade da matriz polimérica e a concentração da solução catiônica na qual a solução polimérica será gotejada.

A matriz formada deve permitir ao micro-organismo a possibilidade de troca de gases e de massa (nutrientes, metabólitos *etc.*), com o meio, mesmo que limitada. Caso a difusão de oxigênio não seja uniforme, as células da superfície do gel migram para o meio externo, ocasionando o rompimento da matriz (OGBONNA, 2000 *apud* GIESE, 2015). Portanto, faz-se necessário escolher previamente o tamanho da partícula e a concentração celular a serem utilizadas no processo.

### 3.5 A TECNOLOGIA DA IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO ADICIONADA DE QUITOSANA

Os prognósticos recentes quanto a utilização dos recursos naturais demonstram uma situação preocupante no que diz respeito à disponibilidade de água para as futuras gerações, pelo aumento do consumo aliado ao agravante da poluição doméstica e industrial. Assim, o processo de descontaminação que emprega microrganismos livres, imobilizados ou ainda, os produtos destes, é considerado uma tecnologia ecologicamente correta, e alternativa que pode ser empregada na biorremediação (CARVALHO, 2006 apud BERGER, 2013).

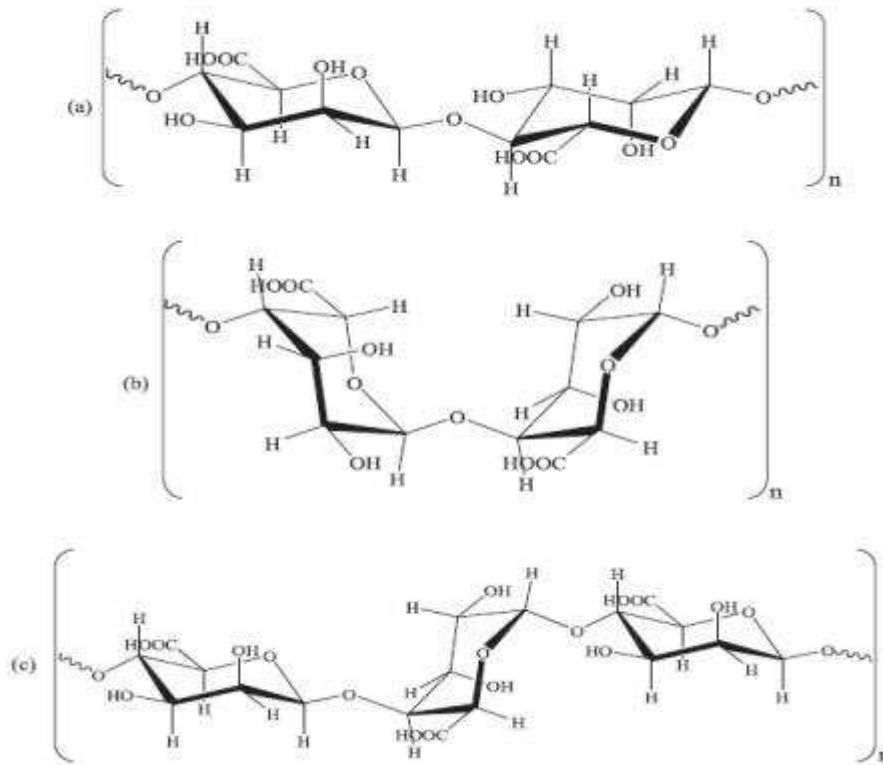
O alginato apresenta propriedades singulares que permitem seu uso em diferentes áreas do conhecimento (MÜLLER et al. 2011). Em função de suas características físico-químicas que permitem sua geleificação, polímero tem sido amplamente utilizado para confinamento de microrganismos na realização de processos fermentativos, produção de fármacos, tratamento de efluentes ou ainda, liberar fármacos de forma controlada.

A tecnologia de IC em alginato surgiu como uma importante ferramenta na manutenção da atividade biocatalizadora dos mesmos quando aplicados a biorreatores. É o polímero mais empregado em tais situações em decorrência das suas vantagens: baixo custo, baixa toxicidade e não comprometimento da fisiologia das células imobilizadas.

Polissacarídeo linear, o alginato apresenta em sua constituição química subunidades monoméricas de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo beta 1,4 e, também, de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo alfa 1,4, o que os enquadra como um heteropolímero (Figura 2). A primeira forma de isolamento desses carboidratos se deu a partir de algas marrons pertencentes aos gêneros *Laminaria* e *Macrocystis*, sendo, posteriormente também produzidos por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*. A proporção de  $\beta$ -manurato e  $\alpha$ -guluronato depende da origem do alginato (GUO et al., 2006 apud RODRIGUES, 2010).



**Figura 3.** Composição do alginato: (a) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; (b) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; (c) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados.



FONTE: RODRIGUES, 2010.

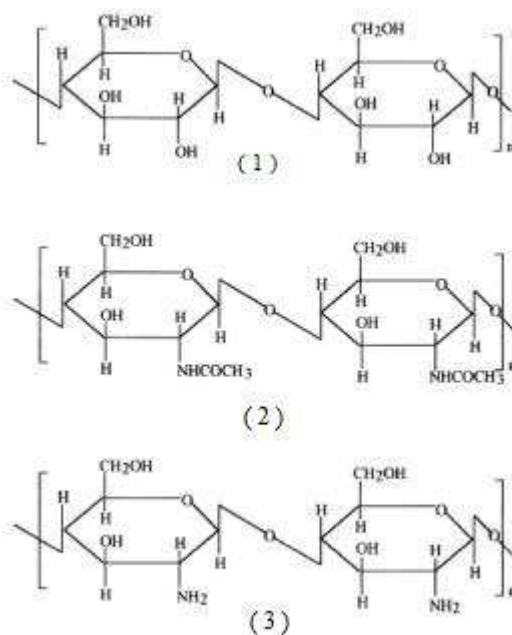
Como já descrito anteriormente, a IC por aprisionamento se dá pela mistura de células microbianas com um composto polimérico de carga negativa. No caso do alginato, a formação de esferas se dá início com a preparação do mesmo com concentração que pode variar de 2% a 4% (m/v), preparado em água destilada. Para obtenção da solubilização do polímero é necessária sua agitação por cerca de 6 horas em agitador magnético, ou 12 horas em agitador orbital em temperatura ambiente. A solução é então gotejada em uma solução iônica de concentração adequada para obtenção do gel que deve apresentar porosidade dependente das condições previamente estabelecidas.

Dentre algumas limitações descritas para o uso da matriz de gel de alginato, destaca-se a baixa estabilidade destes géis na presença de certos componentes, os quais podem promover rupturas e a dissolução das esferas formadas, a exemplo fosfato e citrato. Este problema pode ser contornado pelo tratamento com quitosana, outro biopolímero, para aumentar a resistência dos biocatalizadores formados (YOO et al. 1996 apud GIESE, 2015).

Dentro desse cenário, a quitosana surge como um polímero com elevado potencial biotecnológico aplicável às mais diversas áreas. Obtida a partir da desacetilação da quitina, geralmente resultante da hidrólise parcial dos grupos acetamida, a quitosana pode ser encontrada naturalmente na parede celular de fungos, que apresentam até 50% deste polímero na sua estrutura. Já a quitina, considerada o segundo biopolímero mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose, é encontrada atuando como elemento estrutural em artrópodes, exoesqueleto de crustáceos, e algas diatomáceas, como também na formação da parede celular de fungos (BERGER, 2013).

Isolada pela primeira vez em 1859 a partir do aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio (DAMIAN *et al.*, 2005), a quitosana (poli[ $\beta$ -(1-4) -2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose]), possui estrutura química molecular similar à celulose, diferindo apenas nos grupos funcionais, sendo os grupos hidroxila (OH) dispostos para a celulose, e o grupamento amino ( $\text{NH}_2$ ) para a quitosana (AZEVEDO *et al.*, 2007), conforme exemplificado na Figura 3. Solubiliza-se apenas na presença de ácidos orgânicos com pH inferior a 6, sendo o ácido acético e o fórmico os mais utilizados.

**Figura 3.** Comparação das estruturas moleculares de (1) – celulose, (2) – quitina e (3) – quitosana.



FONTE: (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Alguns fatores afetam a eficiência da desacetilação e consequentemente as características das quitosanas obtidas tais como: a) temperatura e tempo de reação; b)

concentração da solução de álcali e adição de diluente (álcoois de cadeia curta e cetonas são empregadas); c) razão quitina/álcali; d) tamanho das partículas de quitina; e) atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização (AZEVEDO et al., 2007).

O alginato apresenta-se como um poliânion e a quitosana é um polication; quando dissolvidos em condições apropriadas, ocorre a interação eletrostática dos grupos carboxílicos do alginato com os grupos amina da quitosana e o resultante entrelaçamento dos dois, formando assim, a membrana que envolve os microrganismos (CRUZ, 2004).

Um fator bastante atraente na quitosana é a possibilidade de modificação física e/ou química, como também sua associação com os outros materiais buscando melhorias em suas propriedades (CUNHA, 2013).

O incremento da quitosana às esferas de alginato tem como objetivo adicionar características vantajosas da mesma na composição das microesferas. Tais propriedades são: a) sua porosidade uniforme, da superfície ao interior, garantindo dessa forma, uma grande difusão do substrato; b) disponibilidade de muitos grupos amina altamente reativos o que permite imobilizar diversas biomoléculas através de ligações covalentes; c) alta estabilidade em ambientes hostis, e hidroflicidade dos produtos formados.

### 3.6 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO E POROSIDADE NA DIFUSÃO DE MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA

Devido à crescente utilização da quitosana na formação de matrizes, diversos parâmetros relacionados à presença da mesma têm sido extensamente estudados sob várias condições, como: a concentração e a massa molar da quitosana; o grau de desacetilação, o pH e a temperatura no processo de geleificação. (CRUZ, 2004).

Apesar das inúmeras pesquisas que vêm sendo realizadas acerca das diferentes formas de se imobilizar células, ainda não se chegou em um consenso de qual material ou metodologia é ideal para cada tipo de IC. Dependendo da aplicação, algumas características devem ser mensuradas quanto à escolha do suporte e ao método de imobilização, levando em consideração os seguintes aspectos: físicos: área superficial disponível, forma, porosidade, volume de poro, densidade; químicos: disponibilidade de grupos reativos e hidrofobicidade; estabilidade: estabilidade mecânica e estocagem; resistência: pH, temperatura, solventes orgânicos; econômicos: disponibilidade e custo da matriz e dos reagentes, equipamentos, impacto ambiental; reacionais: limitações difusionais, cinética da reação (MARTINS, 2007).

Considerando o tratamento de águas residuárias, no que diz respeito à morfologia do suporte, a porosidade é uma fator determinante para a otimização da cinética do bioprocessamento, já que ela permite, ou não, o acesso das células ao meio, e conseqüentemente, às moléculas a serem removidas e/ou biorremediadas, a exemplo do fósforo, coliformes termotolerantes, matéria orgânica entre outros. Isso leva à procura por matrizes com alta porosidade, o que permite uma grande área superficial interna, e poros com diâmetro suficiente para que as células realizem suas atividades bioquímicas de forma eficiente sem escapar para o meio (VIEIRA, 2009).

A propriedade que um fluido apresenta de resistir à deformação por tensões cisalhantes é denominada viscosidade. É possível conferir às soluções poliméricas aumento de viscosidade com a adição de pequenas concentrações de quitosana, em meio ácido, devido a sua alta massa molecular e estrutura linear (BEZERRA, 2011).

Conforme já explicitado anteriormente, na interação alginato/quitosana há a junção de um polímero catiônico, o alginato, com um polímero aniônico, a quitosana. Juntos em solução aquosa eles formam o PEC, Complexo Polieletrólítico. No caso do alginato de cálcio e da quitosana esses compostos se ligam através de interação iônica, o que confere mais estabilidade e resistência aos dois polímeros diminuindo os poros das microesferas. (SOUSA, 2016).

Com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura, já foi possível observar a morfologia dos tipos de poros encontrados na estrutura da quitosana (AZEVEDO et al., 2007), no entanto, há uma carência de trabalhos científicos que relacionem concentrações de quitosana com a porosidade das microesferas.

Torna-se necessário encontrar uma concentração de quitosana ideal, que auxilie na estabilidade e resistência das microesferas sem interferir na porosidade das mesmas, contribuindo para o acontecimento das reações bioquímicas e conseqüentemente, otimização do tratamento dos resíduos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências físicas da Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários (EXTRABES), pertencente à Universidade Estadual da Paraíba, situada no bairro do Tambor, na cidade de Campina Grande – PB, Região Nordeste do Brasil (7°13'11''sul, 35°52'31'' oeste e 550 m acima do nível do mar).

### 4.2 MATERIAL

- ✓ Agitador magnético TECNAL-TE-085
- ✓ Autoclave do modelo Phoenix
- ✓ Balança de precisão FA2104N
- ✓ Bomba peristáltica da marca Milan

### 4.3 ETAPAS DO TRABALHO

#### ✓ **Preparação da solução de alginato de sódio**

O preparo das soluções de alginato foi baseado no método de PASPARAKIS e BOUROPOULOS (2006). Eles definiram a concentração da solução de alginato de sódio em 4% m/v. E como o alginato é solúvel em água, esta foi escolhida como solvente. Dessa forma, pesou-se 4 g de alginato marca Aldrich e solubilizou-se o mesmo em 100 mL de água destilada. Para total solubilização das amostras as mesmas foram levadas para autoclave, onde permaneceram durante 15 minutos a 121°C.

#### ✓ **Preparação da solução de quitosana**

Esse método é uma modificação do preparo feito por BRANT (2008). Para a solubilização da quitosana utilizou-se o ácido acético diluído a 2% (v/v) em água destilada, em triplicata. A cada béquer contendo uma solução de ácido acético foram adicionados 1%, 2% e 3% (m/v), respectivamente. Essas soluções foram levadas para agitador magnético por 2 h a 40°C sob agitação de.

#### ✓ **Preparação da solução de Cloreto de Cálcio**

Segundo Berger e colaboradores (2014b apud RODRIGUES, 2008). O íon  $\text{Ca}^{2+}$  é indicado para formação de sistemas estabilizados contendo alginato dando às esferas forma bem definida e segurança no manuseio. Foram preparadas três soluções a 4% (m/v) de  $\text{CaCl}_2$  e levadas para a autoclave onde permaneceram durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

#### ✓ **Preparação das esferas de (AG/QT)**

A cada Erlenmeyer contendo solução de alginato preparada anteriormente foi adicionada uma solução de quitosana com concentração conhecida, também previamente preparada. A literatura ressalta a importância do controle da vazão, bem como da adição da solução de quitosana na solução de alginato durante a formação dos complexos iônicos (WANG ET AL., 2001). Portanto, a quitosana foi incorporada manualmente aos poucos ao alginato, sob constante agitação, e em seguida, homogeneizados a 500 rpm durante 30 minutos em agitador magnético. Para formação das esferas foi utilizada bomba peristáltica com vazão de 15 mL/min. Uma extremidade da mangueira foi imersa na solução (AG/QT) enquanto a outra permaneceu preso a um suporte para gotejamento na solução de  $\text{CaCl}_2$  a 0,4 M, sob agitação magnética.

#### ✓ **Medição do diâmetro das esferas**

Após serem submetidas à secagem, foram separados três tubos de Falcon, contendo 30 esferas cada, com as mesmas formadas a partir das concentrações distintas de quitosana, 1%, 2% e 3%, respectivamente. Mediu-se o diâmetro das esferas com auxílio de um paquímetro.

#### ✓ **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A Microscopia Eletrônica de varredura foi realizada no intuito de avaliar a morfologia externa e porosidade das microesferas a base de alginato/quitosana. Dois grupos de esferas contendo diferentes concentrações de quitosana foram levados para observação em microscópio eletrônico de varredura. Grupo 1: esferas de alginato/quitosana contendo 1%, 2% e 3% de quitosana, imersas em água destilada. Grupo 2: esferas de alginato/quitosana contendo 1%, 2% e 3% de quitosana, secas conforme já descrito anteriormente. As amostras foram analisadas em colaboração com a Embrapa Agroindústria Tropical localizada em Fortaleza – CE, segundo a metodologia descrita a seguir: As amostras foram montadas em stubs com o auxílio de fita adesiva condutora, e recobertas com ouro em metalizadora Emitech. Por fim, foram levadas ao MEV TESCAN, modelo VEGA 3 SBU, sob uma voltagem de aceleração de 15 Kv, para visualização e obtenção das imagens.

### ✓ Caracterização das esferas de alginato/quitosana

As esferas contendo diferentes concentrações de quitosana, 1%, 2% e 3% respectivamente, foram caracterizadas através dos seguintes ensaios: A) Intumescimento; e B) Degradação.

O grau de intumescimento (GI) foi determinado com o objetivo de verificar o comportamento das amostras em meio líquido semelhante ao do efluente. Dessa forma, as esferas foram secas em estufa a 40 °C por 24 horas e pesadas em balança analítica. Posteriormente, foram imersas em solução tampão fosfato (PBS) e armazenadas em estufa bacteriológica a 37 °C, sendo retiradas, reduzindo o excesso de solução com o auxílio de papel filtro, e pesadas em balança analítica nos tempos de 30 minutos, 2, 4, 6 e 24 horas. Por fim, o GI foi calculado de acordo com a Equação 1 para cada amostra no tempo t.

$$GI = \frac{Mt - Mi}{Mi} \times 100 \text{ Eq. (1)}$$

Onde,

Mt = Peso da amostra no tempo t

Mi = Peso inicial da amostra

Os ensaios de degradação foram executados com o objetivo de avaliar a perda de massa das esferas em relação ao tempo, simulando as condições nas quais as mesmas serão empregadas.

As amostras foram secas em estufa à 40 °C por duas horas, pesadas em balança analítica e divididas em dois grupos: no primeiro, as membranas foram imersas em água destilada no segundo, as esferas foram imersas em esgoto obtido na própria EXTRABES. Ambos os grupos foram incubados em estufa microbiológica à uma temperatura de 37 °C por 7 dias. Ao fim da incubação, lavou-se várias vezes as membranas com água destilada, secou-as por 24 horas em estufa à 40 °C e pesou em balança analítica. Para obtenção dos resultados, utilizou-se a Equação 2.

$$B = \frac{Mi - M}{Mi} \times 100 \text{ Eq. (2)}$$

Onde,

$M$ =Peso final

$M_i$ =Peso inicial



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

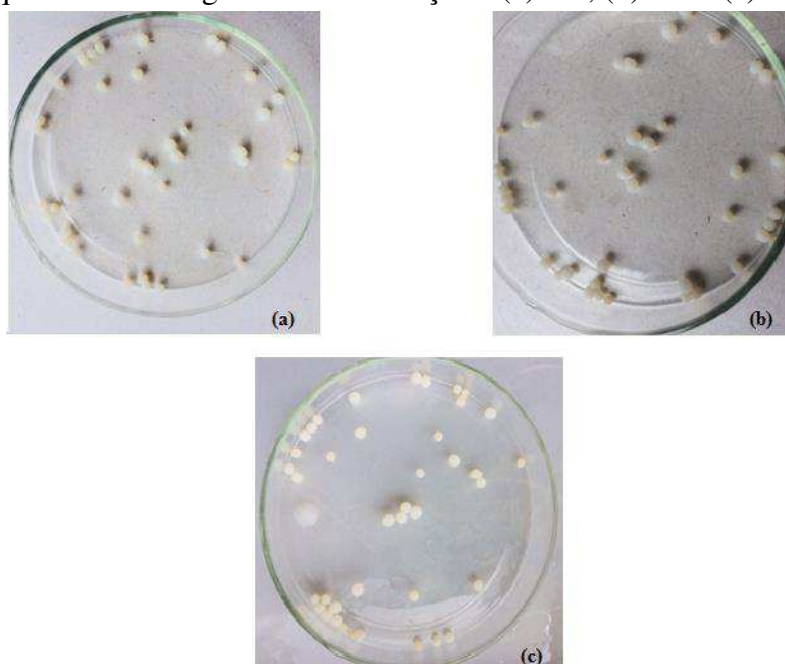
Nesse item do trabalho serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, enfocando a influência das diferentes concentrações de quitosana na morfologia das esferas de alginato/quitosana, sua caracterização e comparação com relação às esferas formadas somente por alginato.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS

Os géis contendo concentrações superiores a 3% de quitosana apresentaram maior resistência à passagem pela bomba, mostrando que o aumento da viscosidade da solução dificulta a extrusão, podendo ocasionar o entupimento da mesma, fator determinante para se trabalhar apenas em concentrações inferiores ou iguais a tal porcentagem.

As esferas formadas apresentaram diversidade de tamanho, coloração bege e formato tendendo a esférico, demonstrado na Figura 5. Conforme a Tabela 4, o diâmetro médio das esferas foi influenciado pelo aumento da concentração de quitosana, mostrando que as duas variáveis são inversamente proporcionais, conforme uma cresce, a outra decresce diferentemente do exposto por Tange e colaboradores (2015) que demonstrou que quanto maior a concentração total de polímero, maior o diâmetro de microesferas produzidas.

**Figura 5.** Fotografia de esferas de alginato/quitosana após secagem, produzidas a uma vazão de 15 mL/min com quitosana nas seguintes concentrações: (a) 1%; (b) 2% e (c) 3%.



Fonte: autor.

**Tabela 4.** Diâmetro médio das esferas de alginato/quitosana com diferentes concentrações de quitosana.

Concentrações	Diâmetro Médio Esferas	Desvio Padrão
1%	3,91	±0,86
2%	3,52	±0,7
3%	3,48	±0,45

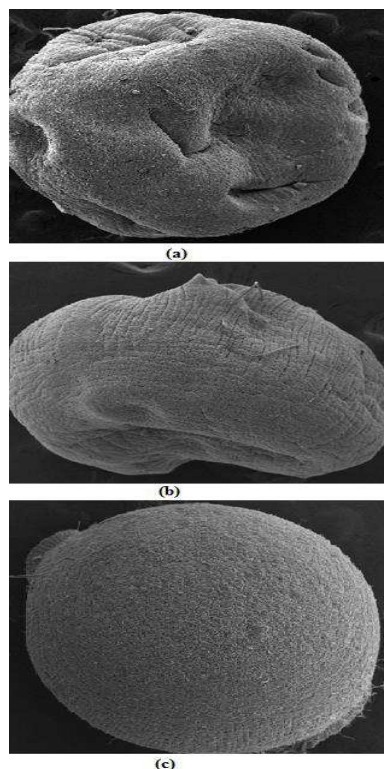
Fonte: autor.

## 5.2 ANÁLISES DA MORFOLOGIA E POROSIDADE DAS MICROESFERAS DE ALGINATO/QUITOSANA UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura fornece informações sobre as características morfológicas das microesferas como a presença de fissuras e poros, permitindo uma análise rápida e direta da eficiência da técnica de aprisionamento em gel.

As diferentes concentrações de quitosana ocasionaram mudanças significativas na morfologia da superfície das esferas conforme exposto na Figura 6. As esferas (b) e (c), escolhidas aleatoriamente, apresentaram irregularidades quanto ao formato esférico se comparadas à esfera (a). Provavelmente, a maior concentração de quitosana observada em (c) favoreceu a manutenção da forma esférica, fato que se deve à força de interação iônica entre os polímeros, o que confere mais estabilidade e resistência às esferas pois resulta na diminuição dos poros das mesmas (SOUSA, 2016). Além disso, a esfera (c) não apresentou deformações, o que é considerado o ideal para o tratamento de efluentes, já que o formato esférico é uma estratégia para incrementar a capacidade de adsorção da quitosana, uma vez que microesferas possuem uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que a quitosana em flocos, o que é evidenciado por Azevedo e colaboradores (2007).

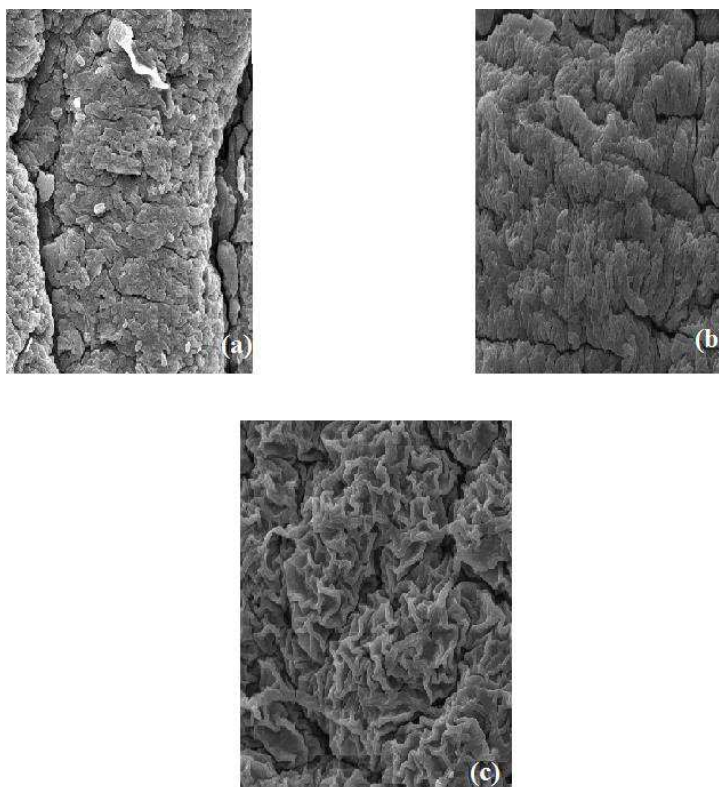
**Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura das esferas de alginato/quitosana após secagem com diferentes concentrações de quitosana: (a) 1% de quitosana; (b) 2% de quitosana e (c) 3% de quitosana. Aumento 155 x. Escala 500  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Embrapa Agroindústria Tropical.

Quanto à porosidade da superfície das esferas, elucidada na Figura 7, uma menor concentração de quitosana mostrada em (a) resultou na obtenção de um material mais compacto e menos poroso, o que é uma característica indesejável segundo Cunha (2013), já que pode comprometer a interação da matriz com o adsorbato, nesse caso das células com o efluente líquido. Em (c) é possível observar uma estrutura bastante rugosa, o que de acordo com Silva (2015) indica uma estrutura mais resistente que serve de proteção para a parte interna da esfera. Além disso, as rugosidades encontradas podem determinar um significativo aumento da área superficial para processos tanto de adsorção quanto de absorção, é tal que alguns polímeros que apresentam superfície lisa recebem tratamentos químicos na indústria para se tornarem rugosos (CARNEIRO, 2001). Os fatos levantados corroboram a idéia de que o aumento da concentração de quitosana também é determinante não só na porosidade das esferas, bem como na formação de estruturas rugosas que aumentam área superficial das mesmas.

**Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura da superfície das esferas com diferentes concentrações de quitosana com aumento de 6.67 kx e escala 10  $\mu\text{m}$ : a) esfera contendo 1% de quitosana; b) 2% de quitosana e c) 3%.

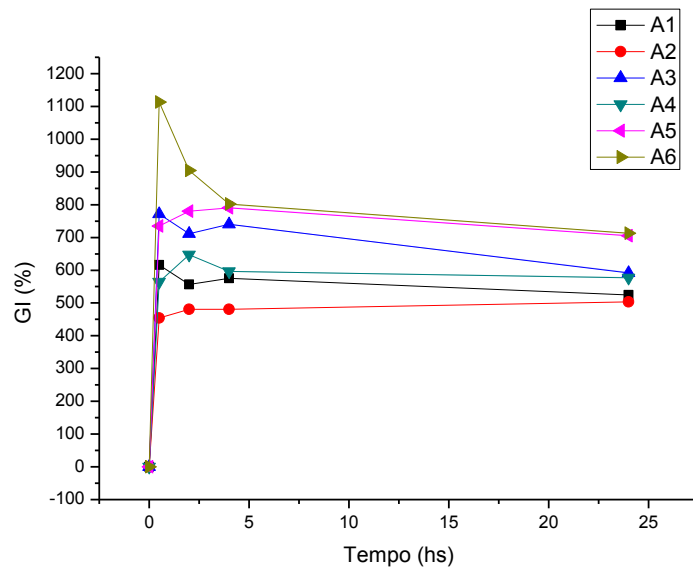


Fonte: Embrapa Agroindústria Tropical.

### 5.3 GRAU DE INTUMESCIMENTO

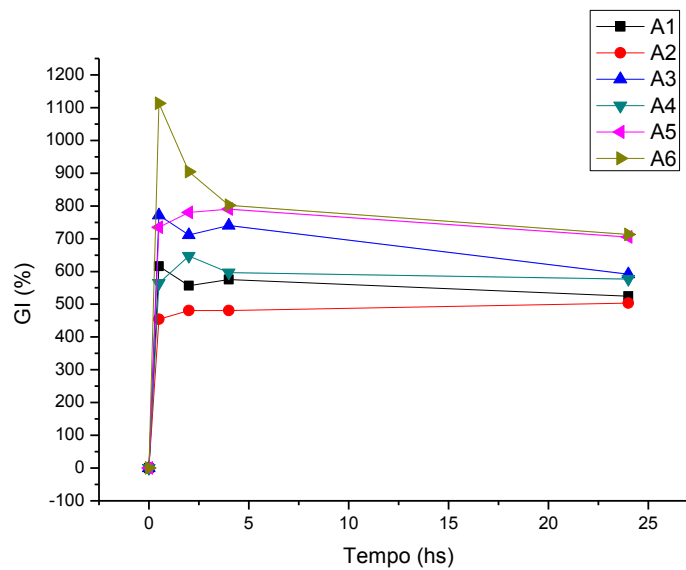
As figuras 8, 9 e 10 apresentam os gráficos de intumescimento em função do tempo para as esferas de alginato/quitosana em água destilada a 25°C contendo as três diferentes concentrações de quitosana. As esferas de alginato/quitosana na proporção 4:1 (m/m) exibiram um intumescimento máximo de 80,57% no tempo de 4 horas, enquanto as esferas na proporção 2:1 (m/m) obtiveram valor máximo de intumescimento de aproximadamente 680% no tempo de 2 horas, e na proporção 4:3 (m/m) o intumescimento máximo chegou a 750% no tempo de 24 horas. Segundo Vieira e colaboradores (2014), confirmou-se que a variável com maior efeito sobre o grau de intumescimento em esferas de alginato é a concentração do polímero. No trabalho em questão não há variação da concentração de alginato, apenas de quitosana, de forma que todas as esferas foram submetidas às mesmas condições de preparação, secagem e imersão. Dessa forma, pode-se afirmar que o aumento da porcentagem de quitosana nas esferas de alginato está diretamente ligado à capacidade de absorção de água das mesmas, pois quanto maior a concentração de quitosana, maior concentração de grupos amina ainda não reticulados, ou seja, livres, formando uma estrutura menos rígida e, por conseguinte, com maior poder absorptivo.

**Figura 8.** Variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 1% de quitosana imersas em água destilada.



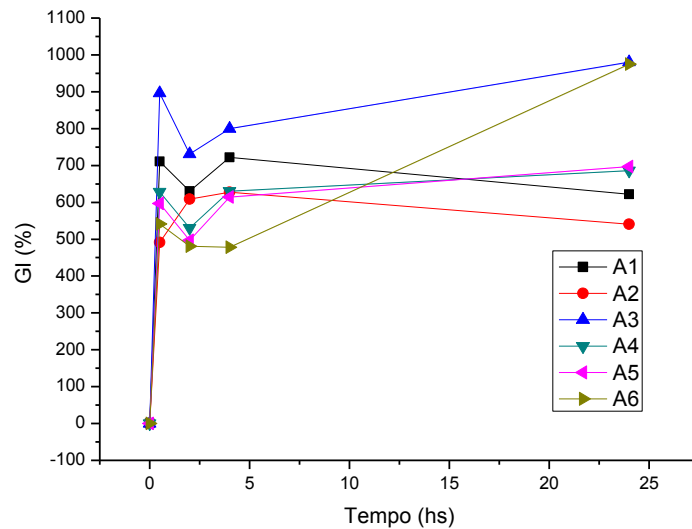
Fonte: autor.

**Figura 9.** Variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 2% de quitosana imersas em água destilada.



Fonte: autor.

**Figura 10.** Variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 3% de quitosana imersas em água destilada.

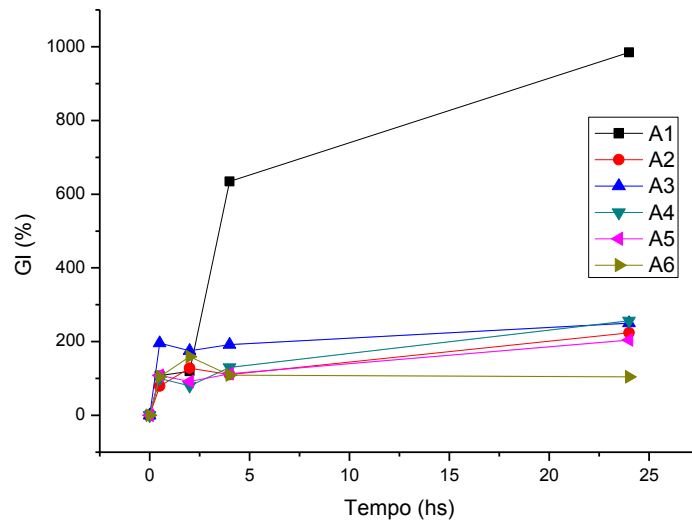


Fonte: autor.

As figuras 11, 12 e 13 demonstram houve um significativo decréscimo na capacidade de intumescimento das esferas imersas em esgoto, em relação às submersas em água destilada, possivelmente devido à quantidade de sólidos suspensos presentes na amostra utilizada que acabaram por bloquear alguns dos poros responsáveis pela passagem do efluente para dentro da esfera, ou ainda, pela adsorção de partículas na superfície da membrana e/ou no interior de seus poros devido a interações entre os solutos presentes na solução a ser tratada e o material da esfera, dificultando assim, o seu intumescimento (VIANA, 2004).

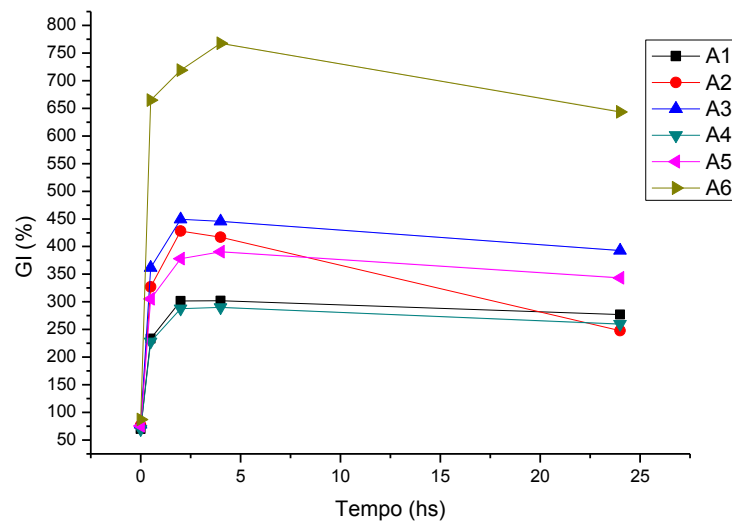
As esferas de alginato/quitosana na proporção 4:1 apresentaram um intumescimento máximo de 341% no tempo de 24 horas enquanto as na proporção 2:1 de 435% em 4 horas, e as na proporção 4:3, 413% em 24 horas. Mesmo sob as condições geradas pelo efluente, as esferas contendo a maiores concentrações de quitosana apresentaram um maior grau de intumescimento, indicando mais uma vez que a concentração do polímero e o intumescimento são variáveis diretamente proporcionais até certo ponto. Levando em consideração apenas esse parâmetro de forma isolada, no caso de ensaios realizados com efluentes, as esferas contendo 2% de quitosana apresentaram um comportamento melhor no que diz respeito ao intumescimento por atingirem uma absorção maior em um menor período de tempo em relação às esferas contendo 3% de quitosana.

**Figura 11.** Variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 1% de quitosana imersas em esgoto.



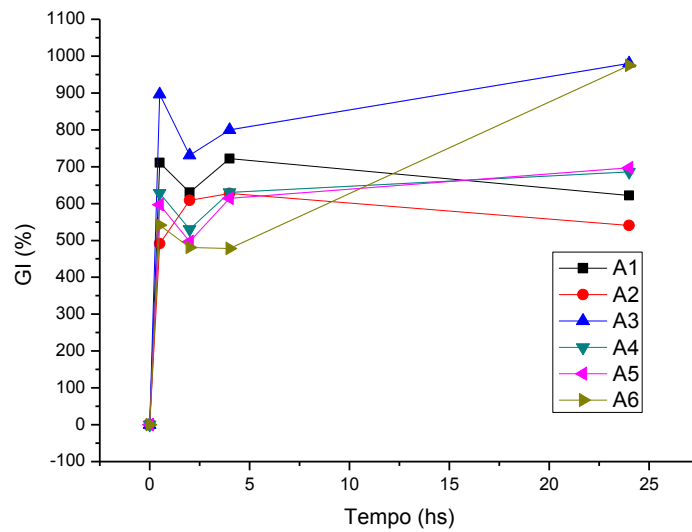
Fonte: autor.

**Figura 12.** Variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 2% de quitosana imersas em esgoto.



Fonte: autor.

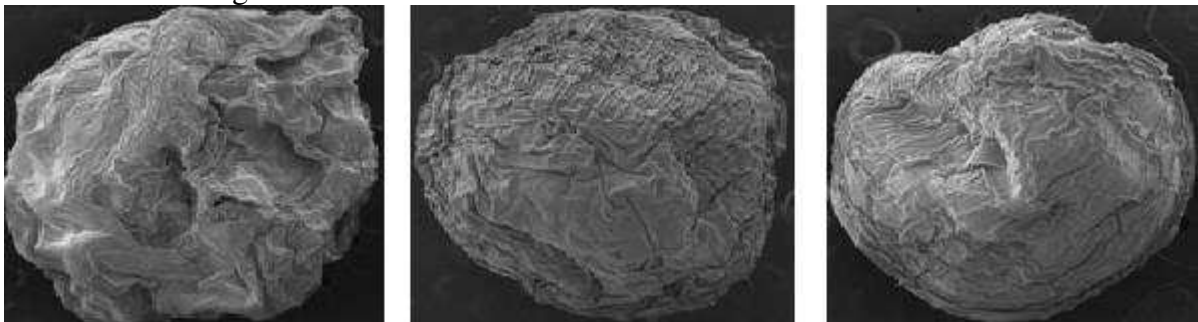
**Figura 13.** Variação do grau de intumescimento com o tempo para esferas contendo 3% de quitosana imersas em esgoto.



Fonte: autor.

A Figura 14 mostra esferas intumescidas em água destilada contendo respectivamente 1%, 2% e 3% de quitosana. É possível observar o formato irregular da esfera formada a partir da menor porcentagem de quitosana (1%) além da sua superfície densa, sem a presença de poros, enquanto as esferas com as maiores concentrações se apresentam com formato bem mais regular tendendo à esfericidade com superfícies altamente rugosas, demonstrando que a concentração de quitosana está relacionada à manutenção da forma esférica também durante o processo de intumescimento.

**Figura 14.** Microscopia eletrônica de esferas contendo 1%, 2% e 3%, respectivamente, intumescidas em água destilada.



Fonte: autor.



#### 5.4 PERDA DE MASSA DAS ESFERAS

Os testes de degradação analisaram a influência da concentração de quitosana na perda de massa das esferas no imersas em água destilada e esgoto, no decorrer de 7 dias. Conforme os dados obtidos e trazidos na Tabela 5, as esferas a 1% quitosana tiveram um elevado percentual de biodegradação média: 50,1% para as imersas em água destilada 63,9% para as imersas em esgoto Já as esferas contendo uma concentração de 2% de quitosana apresentaram uma biodegradação média relativamente menor se comparadas com a amostra relatada anteriormente: 49,55% para as imersas em água destilada; 59,53% para as esferas em esgoto (Tabela 6). As esferas a 3% quitosana apresentaram os seguintes resultados: 46,49% para as esferas em água destilada 51,70% em esgoto (Tabela 7). Os ensaios mostraram que para as maiores concentrações de quitosana, há uma menor perda de massa das esferas, tanto para o esgoto quanto para a água destilada, para um mesmo período de tempo, o que correlaciona diretamente duas novas variáveis: concentração de quitosana e biodegradação. No entanto, as esferas imersas em esgoto sofreram maior biodegradabilidade, fato que provavelmente se deve à presença de alguns minerais quelatos como cálcio, ferro, zinco e magnésio que se ligam a grupos amino por ligações covalentes (OLIVEIRA, 2008). A quitosana, por apresentar muitos grupos amino se ligou a esses minerais o que corroborou para a sua desintegração e eventual perda de massa.

**Tabela 5.** Tabela contendo os dados de biodegradação para as esferas com concentração de 1% em quitosana, imersas em água destilada e esgoto, em porcentagem, respectivamente.

<b>Amostras</b>	<b>B<sub>H2O</sub> (%)</b>	<b>B<sub>ESGOTO</sub> (%)</b>
<b>E1</b>	28,57	50
<b>E2</b>	50	66,67
<b>E3</b>	64	66,67
<b>E4</b>	40	69,23
<b>E5</b>	60	58,33
<b>E6</b>	58,06	72,41
<b>Média (MQC1)</b>	50,10	63,89
<b>Desvio Padrão</b>	13,56	8,25

Fonte: autor.

**Tabela 6.** Tabela contendo os dados de biodegradação para as esferas com concentração de 2% em quitosana, imersas em água destilada e esgoto, em porcentagem, respectivamente.

<b>Amostras</b>	<b>B<sub>H2O</sub> (%)</b>	<b>B<sub>ESGOTO</sub> (%)</b>
<b>E1</b>	68,93	89,01
<b>E2</b>	78,31	80,10
<b>E3</b>	38,24	57,14
<b>E4</b>	42,50	72,22
<b>E5</b>	38,78	25,37
<b>E6</b>	30,56	33,33
<b>Média (MQC1)</b>	49,55	59,53
<b>Desvio Padrão</b>	19,27	25,73

Fonte: autor.

**Tabela 7.** Tabela contendo os dados de biodegradação para as esferas com concentração de 3% em quitosana, imersas em água destilada e esgoto, em porcentagem, respectivamente.

<b>Amostras</b>	<b>B<sub>H2O</sub> (%)</b>	<b>B<sub>ESGOTO</sub> (%)</b>
<b>E1</b>	34,62	14,29
<b>E2</b>	49,06	15,09
<b>E3</b>	15	50,70
<b>E4</b>	80,45	47,83
<b>E5</b>	41,67	94,85
<b>E6</b>	58,14	87,50
<b>Média (MQC1)</b>	46,49	51,70
<b>Desvio Padrão</b>	22,14	34,34

Fonte: autor.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Maiores concentrações de quitosana influenciaram no tamanho das esferas, sendo que para maiores níveis de quitosana o tamanho das esferas foi menor, aumentando a área superficial;
- ✓ Maiores concentrações de quitosana resultaram em superfícies mais porosas;
- ✓ Maiores concentrações de quitosana foram responsáveis pelo aparecimento de enrugamentos nas esferas o que configura uma maior área de adsorção e/ou absorção;
- ✓ Maiores concentrações de quitosana foram responsáveis pelo maior grau de intumescimento, mostrando que as duas variáveis estão diretamente interligadas;
- ✓ A perda de massa foi menor para esferas contendo maiores concentrações de quitosana mostrando que essas esferas degradam menos na presença de maiores níveis do polímero.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. Apresentação de projetos de aterros sanitários de resíduos sólidos urbanos NBR - 8419, São Paulo: ABNT, 1984.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; M. COSTA, A.C.F. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n.3, p. 27-34, 2007.

BERGER, L. R. R. **Produção e Caracterização de Quitina e Quitosana por Rhizopus arrhizus e Cunninghamella elegans e Aplicação em Membranas na Remoção de Cádmi**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE. 2013.

BEZERRA, A. M. **Síntese e avaliações físico-químicas e biológicas de derivados da quitosana de alta e baixa massa molecular**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BRANT, A. J. C. **“Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de mistura de soluções de quitosana e poli-(n-vinil-2-pirrolidona)”**. 2008. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Paulo.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Cidades sustentáveis: subsídios à elaboração da Agenda 21 brasileira**. Brasília: MMA, 2000.

BRASIL. Lei n. 12.305, de 02 de ago, de 2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**, Brasília, DF, ago 2010.

BUITRÓN, G. e GONZÁLES, A. Wat. **Sci. Tech.**, 34: 289 (1996 ).

CARNEIRO, M. P. **Caracterização das propriedades de superfície de filmes de polipropileno tratados com descarga corona**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP. 2001.

COVIZZI, L. G. **Seleção de um suporte sintético para imobilizar células do botryosphaeriarhodina e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual de São Paulo, São José do Rio Preto. 2007.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H. et al. **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, vol. 28, no 2, p. 143-160, 2007.

CUNHA, B. S. **Adsorção de íons cobre em esferas porosas de quitosana na presença de líquidos iônicos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP. 2013.

CRUZ, M. C. P. **Influência do poli (etileno glicol) (PEG) no processo de microencapsulação da oxitetraciclina no sistema alginato/quitosana: modelamento "in vitro" da liberação oral**. 2004. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A. de; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; et al. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 195-205, abr./jun. 2005.

DANG, N.T.T. et al., Water-soluble chitosan-derived sustainable materials: towards filaments, aero gels, microspheres, and plastics, **Soft Matter**, v. 13, p. 7292-7299, 2017.

DÍAZ, E.; FERNÁNDEZ, A.; PRIETO, M. A.; GARCÍA, J. L. Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 523-569, 2001.

FENICE, M.; FEDERICI, F.; SELBMANN, L.; PETRUCCIOLI, M. Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 271-276, 2000.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 5, p. 335-345, 1998.

GANIGUÉ, R. et al. Partial ammonium oxidation to nitrite of high ammonium content urban landfill leach, **Water Research**, v. 41, n. 15, p. 3317-3326, 2007.

GIESE, E. C. **Potencial biotecnológico de uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2015. (Série Tecnologia Ambiental, 81).

GROBOILLOT, A.; BOADI, D.K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R.J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 14, p. 75-107, 1994.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa nacional de saneamento básico 2000**. IBGE; Rio de Janeiro, 2002. 397p.

KJELDSEN, P.; CHRISTOPHERSEN, M. Composition of leachate from old landfills in Denmark. **Waste Management & Research**, v. 19, n. 3, p. 249-256, 2001.

LANGE, L. C.; ALVES, J. F.; AMARAL, M. C. S.; JÚNIOR, W. de R. M.; **Engenharia Sanitária Ambiental**, vol. 11, p. 175-183, 2006.

MARTINS, C. L. **Tratamento de lixiviado de aterro sanitário em sistema de lagoas de estabilização sob diferentes condições operacionais**. 240f. Tese (Doutorado em Engenharia do Ambiente), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 2010.

MARTINS, R. F. **Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP. 2007.

MOREIRA, M. T.; PALMA, C.; FEIJOO, O.; LEMA, J. M. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidized bed bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 66, p. 27-39, 1998.

NORTON, S.; WATSON, K.; D'AMORE, T. Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeastcells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 18-24, 1995.

OLIVEIRA, R. F. **Morfometria computacional de órgãos de frangos de corte submetidos a duas dietas distintas: suplementação mineral quelada versus suplementação mineral tradicional.** Tese (Doutorado em Bioinformática), Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

OZTURK, I.; ALTINBAS, M.; KOYUNCU, I.; ARIKAN, O.; et al. **Waste Management** 2003, 23, 441.

PASPARAKIS, G; BOUROPOULOS, N. "Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 34-42, 2006.

PAULA E SILVA, M. C. C. **Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella sp.* imobilizada em matriz de alginato de cálcio.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Campina Grande-PB, 2011.

PRADELLA, J. G. C.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; et al. **Reatores com células imobilizadas.** In: Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 4 v. v 2, cap. 16, p. 355-372.

RATUSZNEI, S. M., RODRIGUES, J. A. D., CAMARGO, E. F. M., ZAIAT, M., BORZANI, W. Feasibility of a stirredanaerobicsequencing batch reactorcontainingimmobilizedbiomass for wastewatertreatment. **Bioresource Technology**, vol. 75, no 2, p. 127-132, 2000.

RODRIGUES, A. P. **Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões.** 173f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP. 2008.

RODRIGUES, H. D. P. **Potencial biossortivo e biodegradativo das células de “*saccharomycescerevisiae*” livres e imobilizadas em alginato de cálcio na remoção de corantes têxteis.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro. Rio Claro – SP. 2010.

SERAFIM, A. C.; GUSSAKOV K. C.; SILVA, F.; CONEGLIAN, C. M. R.; et al. Chorume, impactos ambientais e possibilidades de tratamentos. **III Fórum de Estudos Contábeis 2003.** Unicamp, 2003.

SILVA, K. M. M. N. **Caracterização de hidrogéissemi-interpenetrantes de alginato e quitosana reticulados com cloreto de cálcio ou glutaraldeído: estudo do efeito das condições de preparo em suas propriedades mecânicas e físico-químicas.** 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2015.

SOUSA, G. S. **Estudo da fermentação alcoólica em um biorreator de leito fixo em sistema contínuo com células de *Saccharomycescerevisiae* imobilizadas em alginato cálcio revestido com quitosana.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Campinas – SP.2017.

SOLDATELLI, V. F.; SCHAWARZBOLD, A. Comunidade fitoplanctônica em lagoas de maturação, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Iheringia**, v. 65, n. 1, p. 75 – 86, 2010.

SUASSUNA, K. **Campanha de Substâncias e Tecnologias Tóxicas**. Greenpeace, São Paulo– Brasil. 2001.

TANG, Z.; HUANG, X.; SABOUR, P. M.; CHAMBERS, J. R.; et al. Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 263 – 270, 2015.

VIANA, P. Z. **Biorreator com membrana aplicado ao tratamento de esgotos domésticos: avaliação do desempenho de módulos de membranas com circulação externa**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima da enzima  $\beta$ -galactosidase *Kluyveromyces fragiles* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), São Carlos – SP, 2009.

WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L.Y. Chitosan-alginate-CaCl<sub>2</sub> system for membrane coat application. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, p. 1134-1142, 2001.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. **Bioprocessing strategies to improve heterologous Biotechnology Advances**, New York, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.