

UNIVERSIDADE DO CEUMA - UNICEUMA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DO MESTRADO EM MEIO AMBIENTE

WELLINGTON DE SOUSA MONTELES

ESTUDO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CARCINICULTURA COM E
SEM BIOAUMENTAÇÃO

São Luís
2018

WELLINGTON DE SOUSA MONTELES

ESTUDO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CARCINICULTURA COM E
SEM BIOAUMENTAÇÃO

Dissertação apresentada à Universidade CEUMA,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em Meio Ambiente,
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dra. Rita de Cássia Mendonça
de Miranda

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Raimunda
Chagas Silva

São Luis

2018

M776e Monteles, Wellington de Sousa.

Estudos de tratamento de efluente da carcinicultura. / Fabiana Nitz. -
São Luís: UNICEUMA, 2018.

44 p. il.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Meio Ambiente. Universidade
CEUMA, 2017.

1. Aquicultura. 2. Bactérias. 3. Tratamento. 4. Biorremediação. 5. Toxidade. I. Miranda, Rita de Cássia Mendonça de. (Orientadora). II. Silva, Fabrício Brito. (Coordenador) III. Título.

CDU: 639.512



**Folha de aprovação da Dissertação de WELLINGTON DE
SOUSA MONTELES defendida e aprovada pela Comissão
Julgadora em 21/05/2018**

Wellington de Sousa Monteles

Wellington De Sousa Monteles

Glauber Cruz

Glauber Cruz

1º Arguidor

Julliana Ribeiro Alves dos Santos

Julliana Ribeiro Alves dos Santos

2º Arguidor

Wolia Costa Gomes

Wolia Costa Gomes

3º Arguidor

Rita de Cássia m. Miranda

Rita de Cássia Mendonça de Miranda

Presidente da Comissão

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto

Pró-Reitor de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão



UNIVERSIDADE DO CEUMA - UNICEUMA
REITORIA
Pró-reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Mestrado em Meio Ambiente

RELATÓRIO DE DEFESA

Relatório de defesa pública de Dissertação do Senhor WELLINGTON DE SOUSA MONTELES no Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente, da Universidade do CEUMA - UNICEUMA.

Ao vigésimo primeiro dia do mês de maio de 2018, na sala de Pós-Graduação da Uniceuma, realizou-se a Defesa da Dissertação do Senhor WELLINGTON DE SOUSA MONTELES, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulado "ESTUDO DO TRATAMENTO DE EFLUENTE DE CARCINICULTURA COM E SEM BIOAUMENTAÇÃO".

Após declarada aberta a sessão, o Sr. Presidente passou a palavra ao candidato para a exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolveram nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclamou o resultado:

| Nome dos participantes da banca | Função | Resultado |
|---------------------------------------|-------------|-----------------|
| 1. Rita de Cássia Mendonça de Miranda | Orientadora | <u>Aprovado</u> |
| 2. Glauber Cruz | Titular | <u>Aprovado</u> |
| 3. Julliana Ribeiro Alves dos Santos | Titular | <u>Aprovado</u> |
| 4. Wolia Costa Gomes | Titular | <u>Aprovado</u> |

Resultado Final:

Parecer da Comissão Julgadora

Glauber Cruz
Glauber Cruz
Primeiro titular da banca

Julliana R. A Santos
Julliana Ribeiro Alves dos Santos
Segundo titular da banca

Wolia Costa Gomes
Wolia Costa Gomes
Terceiro titular da banca

Rita de Cássia M. Miranda
Rita de Cássia Mendonça de Miranda (Orientadora)
Presidente da comissão julgadora

O título foi homologado pela comissão de Pós-graduação em 25 / 05 / 2018 e, portanto, o aluno faz jus ao título de Mestre em Meio Ambiente obtido no programa de Mestrado.

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Pró-reitor de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado força e saúde para poder enfrentar os desafios de um mestrado.

À minha esposa, Abigail Milen, pelo incentivo e insistência para que eu fizesse o mestrado, pois por vontade própria seria difícil.

A minha professora e orientadora, Rita de Cássia Mendonça de Miranda, pelos seus ensinamentos e orientação, por ter me acolhido e não me abandonado, pela paciência em ter aguentado meu estresse, sempre serei grato por tudo que você fez.

A minha coorientadora e professora, Maria Raimunda Chagas Silva, aos professores, Luis Cláudio Nascimento da Silva, Julliana Ribeiro Alves dos Santos e Wolia Costa Gomes, agradeço a contribuição dada ao nosso trabalho.

A todos os professores do mestrado pelo conhecimento transmitido.

À Universidade CEUMA pela estrutura dos laboratórios.

Ao Instituto Federal do Maranhão – Campus Bacabal

Aos alunos de pesquisa Ábia Martins, Queren Hapuque, Thainá Barros, Hermerson Maia, Simeone Castelo Branco, Patrícia Zago, pela contribuição no trabalho.

Aos meus pais, irmãos e amigos pelo incentivo e torcida por meu crescimento profissional.

RESUMO

A aquicultura pode ser definida como o cultivo de organismos (animais e plantas) que têm na água marinha, salobra ou doce o seu principal habitat. Dentre os diversos ramos da aquicultura, um dos mais praticados é a carcinicultura. Em termos globais, a produção e o desempenho financeiro da carcinicultura alcançaram resultados excelentes, entretanto, o rápido e, muitas vezes, desordenado crescimento dessa atividade gerou uma série de problemas ambientais, econômicos e sociais. Dentre as alternativas mitigadoras propostas, está o reaproveitamento do resíduo sólido para obtenção de polímeros de interesse biotecnológico como a quitosana, por exemplo, além disso, o biotratamento do efluente líquido gerado pelas fazendas de camarões, por microrganismos, através de técnicas de biorremediação. Nesse contexto, esse trabalho objetiva o tratamento de resíduo líquido gerado pelas fazendas de camarão por microrganismos livres e imobilizados, e o reaproveitamento do resíduo sólido. Para isso, foram coletados os resíduos e caracterizados físico-quimicamente. O resíduo sólido foi reaproveitado para a extração da quitina e elaboração da quitosana, e foi utilizado como suporte para imobilização de *Lactobacillus plantarum* utilizado para tratamento do resíduo líquido. As condições físicas e nutricionais foram estabelecidas com *Lactobacillus plantarum* livre e imobilizado através de metodologias estatísticas por meio da análise de variância (ANOVA) e por métodos estatísticos multivariados de análises de componentes principais (ACP) e Índice de Correlação de Spearman. Com as condições ótimas estabelecidas, foi realizado um biotratamento em escala laboratorial do resíduo líquido com os lactobacilos livres e imobilizados, para avaliação dos parâmetros de qualidade e toxicidade gerada pelos metabólitos intermediários liberados no processo de tratamento. O Ensaio 7 do planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), apresentou os valores mais baixos em relação às demais condições testadas. Após cinco dias de experimento nas condições de 0 de inóculo e agitação de 90rpm obteve-se 4.5mg/L de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), 69.22mg/L de Demanda Química de Oxigênio, 0.6mg/L de Nitrato, e 0,15 mg/L de nitrito. Os demais experimentos apresentaram resultados desfavoráveis, muito acima do que é estabelecido pela resolução CONAMA 357/05. Dessa forma, conclui-se que o processo de aeração do efluente dos tranques de armazenamento é suficiente para deixar os parâmetros físico-químicos e ecotoxicológico dentro de condições aceitáveis pelos órgãos ambientais e ainda torna o processo barato e acessível para qualquer carcinicultor que deseja realizar essa prática como fonte de renda.

Palavras-chaves: Aquicultura, bactéria, tratamento, biorremediação, toxicidade.

ABSTRACT

Aquaculture can be defined as the cultivation of organisms (animals and plants) that have in marine, brackish or sweet water their main habitat. Among the various branches of aquaculture, one of the most practiced is shrimp farming. Overall, the production and financial performance of shrimp farming achieved excellent results, however, the rapid and often disorderly growth of this activity has generated a number of environmental, economic and social problems. Among the proposed mitigating alternatives is the reuse of the solid residue to obtain polymers of biotechnological interest such as chitosan, for example, in addition, the biotreatment of the liquid effluent generated by the shrimp farms, by microorganisms, through bioremediation techniques. In this context, this work aims at the treatment of liquid residue generated by shrimp farms by free and immobilized microorganisms, and the reuse of the solid residue. For this, the residues were collected and physico-chemically characterized. The solid residue was reused for chitin extraction and chitosan elaboration and was used as support for the immobilization of *Lactobacillus plantarum* used to treat the liquid residue. The physical and nutritional conditions were established with free and immobilized *Lactobacillus plantarum* through statistical methodologies through analysis of variance (ANOVA) and multivariate statistical analysis of main component analysis (PCA) and Spearman Correlation Index. With the optimal conditions established, a laboratory scale biotreatment of the liquid residue with the free and immobilized lactobacilli was performed to evaluate the parameters of quality and toxicity generated by the intermediary metabolites released in the treatment process. Experiment 7 of the experimental design of the Rotational Central Composite Design (DCCR), presented the lowest values in relation to the other conditions tested. After five days of experimenting in the 0 inoculum and 90 rpm agitation conditions, we obtained 4.5mg/L of Biochemical Oxygen Demand (BOD), 69.22 mg/L Chemical Oxygen Demand, 0.6 mg/L Nitrate, and 0,15 mg/L nitrite. The other experiments presented unfavorable results, much higher than what is established by CONAMA Resolution 357/05. Thus, it is concluded that the process of aeration of the effluent from the storage tanks is sufficient to leave the physico-chemical and ecotoxicological parameters within conditions acceptable to the environmental agencies and still makes the process inexpensive and accessible to any grower who wishes to perform this practice as a source of income.

Keywords: Aquaculture, bacteria, treatment, bioremediation, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Microestrutura da quitosana aumentada em 2500x | 23 |
| Figura 2: Microestrutura da quitosana aumentada em 2500x | 23 |
| Figura 3: Teste de mutagenicidade do efluente de carcinicultura sem tratamento, utilizando a bactéria <i>E. coli</i> GM 7330. (C ⁺ - Controle positivo; E – efluente; C ⁻ - Controle negativo) | 28 |
| Figura 4: Análises de Componentes Principais utilizados no tratamento de efluente de carcinicultura | 32 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1: Percentual de sobrevivência da larva <i>Tenebrio molitor</i> exposta ao efluente de carcinicultura sem tratamento | 27 |
| Gráfico 2: Citotoxicidade dos efluentes de carcinicultura sem tratamento | 27 |
| Gráfico 3: Superfície de resposta: Nitrato em função das variáveis agitação e inoculo | 34 |
| Gráfico 4: Superfície de resposta: Nitrito em função das variáveis agitação e inoculo | 34 |
| Gráfico 5: Perfil cinético do tratamento do efluente em condições abióticas e com <i>Lactobacillus plantarum</i> imobilizado em quitosana | 36 |
| Gráfico 6: Percentual de sobrevivência da larva <i>Tenebrio molitor</i> exposta ao efluente de carcinicultura com tratamento | 38 |
| Gráfico 7: Citotoxicidade do efluentes de carcinicultura com tratamento | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Matriz do Planejamento Experimental Fatorial Fracionado do Tipo DCCR | 19 |
| Tabela 2: Caracterização do Resíduo Sólido proveniente da Carcinicultura | 22 |
| Tabela 3: Parâmetros físico-químicos e metais do efluente líquido..... | 25 |
| Tabela 4: Matriz do planejamento experimental e resultado após execução dos onze ensaios preconizados com o microrganismo livre | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ACP | – Análise de Componentes Principais |
| ATCC | – American Type Culture Collection |
| CONAMA | – Conselho Nacional de Meio Ambiente |
| DBO | – Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| DCCR | – Delineamento Composto Central Rotacional |
| DQO | – Demanda Química de Oxigênio |
| EDS | – Espectro de Dispersão de Energia |
| MEV | – Microscópio Eletrônico de Varredura |
| MTT | – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium] |
| pH | – Potencial Hidrognônico |
| TOS | – Sólidos Orgânicos Totais |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 2.1. COLETA DO RESÍDUO SÓLIDO E LÍQUIDO..... | 14 |
| 2.2. CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO LÍQUIDO | 14 |
| 2.3. MICRORGANISMOS..... | 15 |
| 2.4. OBTENÇÃO DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO | 15 |
| 2.4.1. <i>Processo de obtenção da quitina</i> | <i>15</i> |
| 2.4.2. <i>Processo de produção de quitosana</i> | <i>16</i> |
| 2.4.3. <i>Imobilização do Lactobacilo em quitosana.....</i> | <i>16</i> |
| 2.4.3.1 <i>Avaliação da produção de quitosanase</i> | <i>16</i> |
| 2.4.3.2 <i>Ensaio de Imobilização.....</i> | <i>17</i> |
| 2.5. ENSAIOS MORFOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS: MICROSCOPIA ELETTRÔNICA DE VARREDURA E SPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER (FTIR)..... | 18 |
| 2.6. DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ATIVIDADE MICROBIANA..... | 19 |
| 2.7. CINÉTICA DO TRATAMENTO DO EFLUENTE | 19 |
| 2.7.1 <i>Cinética de Tratamento com as Condições Otimizadas</i> | <i>19</i> |
| 2.7.2 <i>Cinética de tratamento com o Lactobacillus plantarum ATCC 8014 imobilizado.....</i> | <i>20</i> |
| 2.8. AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE | 20 |
| 2.8.1. <i>Toxicidade Aguda</i> | <i>20</i> |
| 2.8.2. <i>Citotoxicidade.....</i> | <i>21</i> |
| 2.8.3. <i>Mutagenicidade.....</i> | <i>21</i> |
| 2.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 21 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 22 |
| 3.1. EXTRAÇÃO DA QUITINA E PRODUÇÃO DE QUITOSANA | 22 |
| 3.2. ENSAIOS MORFOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS: MICROSCOPIA ELETTRÔNICA DE VARREDURA..... | 23 |
| 3.3. IMOBILIZAÇÃO DO MICRORGANISMO EM QUITOSANA: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITOSANASE | 24 |

| | |
|---|----|
| 3.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE | 24 |
| 3.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EFLUENTE SEM TRATAMENTO (IN NATURA) | 26 |
| 3.5.1. Toxicidade Aguda | 26 |
| 3.5.2. Citotoxicidade | 27 |
| 3.5.3. Mutagenicidade | 28 |
| 3.6. DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ATIVIDADE MICROBIANA | 28 |
| 3.6.1. Análise de Componentes Principais | 31 |
| 3.6.2. Metodologia de Superfície Resposta | 32 |
| 3.6.3. Cinética de Tratamento com as Condições Otimizadas e o <i>Lactobacillus plantarum</i> imobilizado | 34 |
| 3.7. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EFLUENTE COM TRATAMENTO | 37 |
| 3.7.1. Toxicidade Aguda | 37 |
| 3.7.2. Citotoxicidade | 38 |
| 4. CONCLUSÃO | 40 |
| BIBLIOGRAFIA | 41 |

1. INTRODUÇÃO

A produção de pescado no mundo é subdividida em pesca e aquicultura. A pesca, de acordo com a finalidade econômica e social, pode ser considerada como amadora industrial ou artesanal (BRASIL, 2013). A Aquicultura pode ser definida como a extração de organismos aquáticos do hábitat onde eles vivem, como rios, lagos, oceanos e mares, para fins como alimentação, recreação, ornamentação e para a fabricação de insumos para a indústria de ração animal (OLIVEIRA & SANTOS, 2011).

Atualmente, as possibilidades concretas de expansão do setor pesqueiro natural estão praticamente esgotadas, pois, de acordo com a Food Agriculture Organization, mais de 52% dos estoques mundiais de pescado já foram explorados, o que pode num futuro não distante acarretar na falta destes produtos a população mundial (FAO, 2009). A aquicultura torna-se uma alternativa para o suprimento deste mercado que apresenta tendência crescente devido ao fato do pescado representar um alimento saudável e de elevado interesse pela população em todas as faixas de renda (BRASIL, 2011).

Dentre os diversos ramos da aquicultura, a carcinicultura, que é o cultivo de camarão em cativeiro, é o que mais cresce no mundo (QUEIROZ *et al.*, 2013). Para Freitas *et al.* (2009), a carcinicultura é o cultivo de camarões em cativeiro, que ocorre principalmente em viveiros de terra, escavados a poucos metros da linha de costa. A carcinicultura é uma atividade de produção de alimentos que tem como pontos positivos a geração de emprego e renda e a diminuição da pressão sobre a exploração da pesca (TUNA & TAGLIDATTO, 2015).

Atualmente, o Brasil ocupa o sexto lugar na lista mundial de produtores (BRASIL, 2011), ficando atrás apenas da China, Tailândia, Vietnã, Índia e da Indonésia (ROCHA, 2015). O Brasil tem como principais consumidores a França, Japão e Espanha, que juntos importam 96% do que é produzido no país (BRASIL, 2011).

No Brasil, a indústria do cultivo de camarão foi objeto de grandes transformações no período de 1978, início de sua produção comercial, até 1996, com a introdução de um “pacote” tecnológico para o cultivo do camarão do pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e, posteriormente, com o avanço científico e tecnológico nos anos de 2000, quando esta atividade atingiu o auge em termo de produtividade (NATORI *et al.*, 2011; ROCHA, 2003). Esse avanço decorreu, em grande parte, da

criação de um conjunto de capacitações e instituições que influenciaram significativamente sua trajetória tecnológica.

No Brasil, o clima favorável e o domínio de novas tecnologias de produção de camarões permitem o estabelecimento do país como um dos principais produtores de camarão das Américas (POERSCH, 2004). Entre as regiões brasileiras, a Nordeste é a que mais se destaca nas atividades de carcinicultura, sendo responsável por 99% do total da produção especialmente os Estados do Rio Grande do Norte e da Bahia, além do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Maranhão, onde a atividade se apresenta em expansão (ABCC, 2013). Essa disparidade em relação aos outros estados da federação está associada, entre outros fatores, à extensa faixa litorânea nordestina e às condições climatológicas, hidrológicas e topográficas ideais para o cultivo do camarão (QUAGLIA, 1993; CASTRO & PAGANI, 2004).

No Estado do Maranhão realizou-se em 2003 o Seminário Nacional de Desenvolvimento da Pesca e da Aquicultura, onde entre outras coisas, estabeleceu-se a criação da Secretaria Estadual de Aquicultura e Pesca, que teve como principal objetivo regularizar e regulamentar a prática no Estado. Apesar de todos os esforços, os problemas ambientais oriundos das fazendas de camarão, ainda são latentes, e muitos dos problemas são gerados pela falta de fiscalização, aja vista que existe um impasse sobre quem fiscaliza a prática, se órgãos estaduais ou federais (BRASIL, 2011).

Em termos globais, a produção e o desempenho financeiro da carcinicultura alcançaram resultados excelentes por um longo período de tempo. Entretanto, o rápido e, muitas vezes, desordenado crescimento dessa atividade gerou uma série de problemas ambientais, econômicos e sociais. Dentre esses, podemos destacar a disseminação de doenças entre os camarões cultivados, desmatamento de manguezais para implantação dos tanques, redução da fertilidade do solo dos viveiros, contaminação das águas e dos sedimentos, salinização de aquíferos, introdução de espécies exóticas, deslocamento e migração de comunidades tradicionais, deterioração da qualidade de vida e da segurança alimentar de comunidades tradicionais, entre outros (ALAM *et al.*, 2005; MEIRELES & QUEIROZ, 2010; PAUL & VOGL, 2011; NOMEN *et al.* 2012; NÓBREGA *et al.* 2013).

Aliado, ainda, a tudo isso, está o impacto ambiental provocado pelos resíduos do camarão, visto que cerca de 40% de sua massa total (cabeça, casca e cauda) é descartado na forma de resíduos sólidos, o que no Brasil promove o acúmulo de toneladas de resíduos todo ano (ASSIS & BRITO, 2008). Diversas soluções têm sido

propostas para mitigar os impactos gerados pelas atividades de carcinicultura, seja para reduzir os efeitos negativos no ambiente ou para garantir a rentabilidade da atividade (SMITH *et al.* 2002).

Dentre as alternativas mitigadoras e objetivos propostos neste trabalho, está o reaproveitamento do resíduo sólido para obtenção de polímeros de interesse biotecnológico como, por exemplo, a produção de quitosana. E o biotratamento do efluente líquido gerado pelas fazendas de camarões, por microrganismos livres e imobilizados, através de técnicas de biorremediação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DO RESÍDUO SÓLIDO E LÍQUIDO

O resíduo líquido utilizado neste trabalho foi fornecido pela fazenda de camarão (Dantas Camarões do Nordeste LTDA) localizada no município de Bacabeiras – MA, foram coletadas duas amostras, 10 litros cada, uma das amostras foi coletada no interior do viveiro (Efluente I), a segunda amostra foi coletada no canal de drenagem, após a despesca do camarão (Efluente II). A matéria prima usada para a extração da quitina e produção da quitosana foi proveniente da retirada da cabeça, casca e cauda do camarão cinza (*Litopenaeus vannamei*), que foi obtido na Feira Municipal da Cohab, São Luis, MA.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO LÍQUIDO

Com o objetivo de caracterizar o resíduo líquido quanto à sua composição e propriedades, foram realizadas as seguintes análises químicas e físico-químicas: potencial hidrogeniônico (pH), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO), Nitrito, Nitrato, Amônia, cloreto, além da Condutividade, Salinidade, Turbidez e Sólidos Orgânicos Totais (TOS). Os procedimentos analíticos são baseados no Standard Methods, AWWA APHA WEF (2005).

Além das análises supra citadas, também foram realizadas as análises dos metais Cobalto (Co), Cobre (Cu), Manganês (Mn), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn).

A toxicidade do efluente foi avaliada em três níveis distintos: toxicidade aguda, citotoxicidade e mutagenicidade do resíduo líquido, antes e depois de serem submetidos

ao biotratamento de acordo com a metodologia descrita a seguir preconizada para cada modelo biológico utilizado.

2.3 MICRORGANISMOS

A linhagem utilizada nesse trabalho foi a do *Lactobacillus plantarum* 8014 ATCC obtido da coleção de *Lactobacillus spp.* da Universidade CEUMA. Com o objetivo de preservar o aparato metabólico, os microrganismos foram estocados em tubos inclinado à 4°C contendo meio de cultura específico e periodicamente foram realizadas repicagens sucessivas.

2.4 OBTENÇÃO DO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO.

2.4.1 Processo de obtenção de quitina.

O processo de obtenção de quitina seguiu as seguintes etapas: pré-tratamento, desmineralização, desproteínização, desodorização e secagem de acordo com metodologia preconizada por Moura *et al.* 2006. Para tal foram utilizadas para os ensaios em escalas laboratorial e piloto uma capacidade de 5kg de matéria-prima.

O pré-tratamento com água corrente, é uma das operações preliminares a obtenção de quitina, e tem como objetivo a separação do material “grosso”, entre eles material vegetal, porções de tecido e outros materiais que eventualmente possam acompanhar o resíduo, e levados à fervura em água a 100 °C por cerca de 2 horas, mantendo-se o nível de água constante. Após, a fervura os exoesqueletos foram secos em forno (temperatura próxima a 240 °C) por 50 minutos. O material seco foi mecanicamente moído e peneirado a fim de obter menor granulometria (0,32 a 0,6 mesh).

A etapa de desmineralização tem por objetivo reduzir o teor de cinzas da matéria-prima. O resíduo foi imerso em ácido clorídrico a 7,0% v/v sob agitação por 30 minutos, após este período seguiu-se três sucessivas lavagens até pH neutro.

A etapa de desproteínização tem a função de reduzir o teor de nitrogênio proteico e consistiu em adicionar solução de hidróxido de sódio 5% p/v a matéria-prima

desmineralizada que se encontra no tanque agitado. Em seguida, foi feita a lavagem deste material, com água, até pH neutro.

Na etapa de desodorização, a matéria-prima desproteïnizada é colocada em um tanque de agitação submersa em uma solução de hipoclorito de sódio 0,36% v/v. O objetivo dessa operação é acentuar a redução de odor proveniente do material e a retirada de pigmentos. Fez-se então a lavagem com água corrente para retirar o hipoclorito de sódio restante, até pH neutro.

Após a desodorização foi necessário a secagem do produto obtido (quitina úmida). Essa secagem foi realizada em temperatura de 80°C por quatro horas, para que a entrada no reator de desacetilação não altere a concentração de solução de NaOH (45°Be).

2.4.2 Processo de produção de quitosana.

O processo de produção de quitosana é realizado a partir da desacetilação da quitina, onde esta reage com solução de NaOH 45°Be (42,3%) sob agitação e aquecimento. A temperatura do reator foi mantida constante a 130°C, durante duas horas. Ao término do tempo de reação foi realizada uma lavagem com água corrente, retirando o excesso do reagente, o que se verifica por meio da medição do pH (SOARES, 2003).

Depois da desacetilação da quitina obtêm-se a quitosana, e esta então deve passar por um processo de purificação. Partindo da quitosana, preparou-se um sal com concentração de 1% de quitosana, em solução de 1% de ácido acético, da qual se obteve a quitosana dissolvida, já que esta é solúvel em ácidos orgânicos diluídos (até pH de aproximadamente 6,0). A solução foi centrifugada, para que seja possível a retirada do material que não foi dissolvido até a obtenção de uma solução com menor quantidade de impureza. A quitosana foi precipitada em solução alcalina até pH de aproximadamente 12,5. Após esta etapa foi feita a neutralização com ácido clorídrico até pH 7,0. A separação foi feita por centrifugação e a secagem em secador de bandejas, até a umidade comercial (6-8%).

2.4.3 Imobilização do *Lactobacilo* em quitosana

2.4.3.1 Avaliação da Produção de Quitosanase

A fim de verificar se o microrganismo poderia causar algum dano ao suporte através da produção de enzima foi avaliada a capacidade de sintetizar e secretar a enzima quitosanase pelo *Lactobacillus plantarum*, para isso a resistência da bactéria à quitosana, foi avaliada inoculando-se 100µL de uma suspensão microbiana em tubos contendo 1 mL de gel de quitosana preparados com 4% do polímero em ácido acético 1% (p/v). Tubos com 1mL de Caldo Nutritivo foram utilizados como controle. As leituras foram realizadas após 1h e 24h de incubação a 30°C, através de subcultivos em placas de Agar Nutritivo (AN) avaliando a produção de quitosanase.

A avaliação da produção enzimática foi realizada em meio Agar Quitosana que consiste de uma solução de 1g de quitosana (GD 65-85%) dissolvida em 200mL de ácido acético 1% que ficou sob agitação por 2h em temperatura ambiente. Essa solução foi misturada com 300mL de uma solução tampão com a seguinte composição por litro: 1,30g de Na₂HPO₄; 3,00g de KH₂PO₄; 0,50g de NaCl; 1,00g de NH₄Cl; 0,24g de MgSO₄ e 0,01g de CaCl₂; pH 6. Separadamente foi preparada 500mL de uma solução a 4% de ágar, posteriormente as duas soluções foram misturadas e distribuídas em placas de Petri de forma asséptica.

A detecção da quitosanase foi realizada conforme protocolo descrito por Park *et al.* (2004). Após crescimento bacteriano em Caldo Nutritivo, uma gota dessa cultura foi dispensada sobre a superfície do meio Ágar Quitosana 0,1% pH 6. As placas foram então incubada a 30°C por 48h e a atividade enzimática foi confirmada pela formação de um halo de inibição ao redor da colônia.

2.4.3.2 Ensaio de Imobilização

Verificando que o microrganismo não era resistente a quitosana, foi realizado o ensaio de imobilização através da técnica de adsorção onde alíquotas de 30 mL de uma suspensão bacteriana previamente padronizada em 10⁷ UFC/mL, foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, as células foram ressuspendidas em 0,5 mL de solução de NaCl 0,9%. Essa suspensão foi transferida para 30 mL de uma solução de quitosana a 4% previamente dissolvida em 1% de ácido acético, autoclavada a 110°C por 10min. A suspensão bacteriana foi homogeneizada e em seguida mantida em agitador magnético por 10 minutos. Após este período 5 mL dessa solução foi gotejada em uma solução de NaOH a 8% para coagulação e formação das esferas.

Posteriormente foram lavadas com 200 mL de solução de NaCl 0,9%, permanecendo por dez minutos.

2.5 ENSAIOS MORFOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E SPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER (FTIR).

A análise morfológica da superfície dos suportes e células imobilizados foram realizadas em Microscópio Electrónico de Varredura (MEV) modelo Quanta 200 FEG que opera em 3 modos de vácuo: alto vácuo; baixo vácuo; e modo ambiental, com potencial de aceleração de 500 V a 30 kV e resolução de 15 Å, acoplado a um Espectrômetro de Dispersão de Energia (EDS). As amostras foram colocadas sobre o porta-amostra do microscópio em fitas de carbono, sob vácuo e serão recobertas com uma camada de carbono, em seguida submetidas à análise. Essas análises foram realizadas logo após a imobilização e após o biotratamento em frascos agitados em biorreator. Com a finalidade de identificar os grupos químicos característicos da quitosana, a sua frequência vibratória foi avaliada em Espectroscopia de Infra Vermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

2.6 DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ATIVIDADE MICROBIANA.

As condições nutricionais para a atividade microbiana foram estabelecida em frascos sob agitação por um período de 5 dias, foi utilizado a metodologia do planejamento experimental fatorial fracionado (2^n) do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), que consiste de dois níveis (-1, +1), dois pontos axiais (-1,41 e +1,41) e três pontos centrais, totalizando 11 experimentos. A matriz experimental, bem como as análises dos resultados foram processadas com o auxílio do software Statistic® 8.0. As variáveis independentes foram as condições físicas do processo (agitação e inóculo), e as variáveis dependentes do processo foram a Demanda Química e Bioquímica de Oxigênio (DQO/DBO), Nitrato e Nitrito, conforme descrito na Tabela 1.

Com as condições físicas e nutricionais do processo selecionadas, os valores ótimos foram estabelecidos utilizando a metodologia estatística de Superfície Resposta. Para isto foi utilizado o software Statistic® 8.0.

Tabela 1 – Matriz do Planejamento Experimental Fatorial Fracionado do Tipo DCCR

| Variáveis independentes | | | | Variáveis dependentes | | | |
|-------------------------|---------|-------------------|------------------|-----------------------|---------------|-------------------|-------------------|
| Valores codificados | | | | Valores reais | | | |
| Agitação | Inóculo | Agitação (RPM) | Inóculo (UFC) | DBO (mg/l) | DQO (mg/l) | Nitrato (mg/l) | Nitrito (mg/l) |
| -1 | -1 | 26 | 0,3 | | | | |
| +1 | -1 | 154 | 0,3 | | | | |
| -1 | +1 | 26 | 0,7 | | | | |
| +1 | +1 | 154 | 0,7 | | | | |
| -1,41 | 0 | 0 | 0,5 | | | | |
| +1,41 | 0 | 180 | 0,5 | | | | |
| 0 | -1,41 | 90 | 0 | | | | |
| 0 | +1,41 | 90 | 1,0 | | | | |
| 0 | 0 | 90 | 0,5 | | | | |
| 0 | 0 | 90 | 0,5 | | | | |
| 0 | 0 | 90 | 0,5 | | | | |

2.7 CINÉTICA DO TRATAMENTO DO EFLUENTE

2.7.1. Cinética de Tratamento com as Condições Otimizadas

Com o objetivo de avaliar o melhor tempo quanto aos parâmetros analisados, a cinética de tratamento do efluente de carcinicultura foi realizada utilizando as condições otimizadas estabelecidas no planejamento experimental. A cinética foi realizada ao longo de cinco dias e a cada 24h as variáveis nitrato e nitrito eram mensuradas para determinação do melhor tempo de tratamento. Após essa etapa a toxicidade aguda e citotoxicidade foram avaliadas para eliminar a possibilidade de ação de compostos tóxicos intermediários frutos de degradação.

2.7.2. Cinética de Tratamento com o “*Lactobacillus plantarum*” ATCC 8014 imobilizado.

Com o objetivo de eliminar a influência biológica exógena na diminuição de compostos tóxicos do efluente foi realizada uma cinética de tratamento com o *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 imobilizado em quitosana obtida da quitina extraída da casca do camarão produzido nos tanques. Para isso foi inoculada uma suspensão de *Lactobacillus plantarum* imobilizado em esferas de quitosana padronizada em 4g/L de efluente e incubada sob agitação de 90rpm a 28°C por cinco dias. A eficiência da condição foi avaliada a cada 24h através das análises das variáveis nitrato, nitrito, Demanda Química e Bioquímica de Oxigênio (DQO e DBO).

2.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Preliminarmente para os testes de toxicidade (toxicidade aguda, citotoxicidade e mutagenicidade) foram utilizadas as duas amostras do efluente, ou seja, efluente I e II. Aquele que se apresentou mais tóxico, comparando os três níveis de toxicidade, foi utilizado no biotratamento com os microrganismos livres e imobilizado.

2.8.1. Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda do efluente líquido (Efluente I e II) foi avaliada empregando modelo *in vivo* da larva *Tenebrio molitor*, onde, com auxílio de uma seringa, foram inoculados 10 µL do controle PBS, do efluente I e do efluente II em 10 larvas cada e acondicionada em placas devidamente identificadas. As larvas foram mantidas em temperatura ambiente por um período de dez dias e a cada 24h eram quantificadas as larvas mortas ou que não respondiam a estímulos. Após essa etapa, o efluente que apresentou o maior nível de toxicidade aguda foi submetido ao biotratamento utilizando técnicas de biorremediação. O efluente foi submetido a 11 ensaios para determinação da condição física e nutricional ótima utilizando do planejamento experimental do tipo DCCR, depois de encontrada a condição ótima do processo, o efluente tratado foi submetido novamente ao teste de toxicidade aguda, conforme descrito acima. Por fim, os dados foram realizados usando GraphPad Prism versão 5.0, com $p < 0,05$ considerado significativo. A curva de sobrevivência foi plotada pela análise de Kaplan-Meier e os resultados foram analisados pelo teste de Log Rank.

2.8.2. Citotoxicidade.

A avaliação da citotoxicidade com o efluente tratado e não tratado foi realizada utilizando a técnica para células aderentes através da avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Para isso foi adicionada 200µL de uma suspensão celular (células de fibroblastos) padronizada em 3×10^5 cels/ml em cada poço da placa e incubada em estufa de CO₂ a 37 °C por 24h. Após este período as células foram tratadas com as soluções controle e o efluente tratado e não tratado e as placas foram novamente incubadas em estufa de CO₂ por um período de 48h, o meio foi retirado e os poços lavados com 200 µL de PBS à 37°C, posteriormente foi adicionado 100 µL de uma solução de MTT padronizada à 0,5 mg/mL e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 3h. A solução de MTT foi retirada e adicionado nos poços 100 µL de DMSO (Dimetil sufóxido) puro. As placas foram agitadas por 5 minutos e depois permaneceram em repouso pelo mesmo período de tempo para realização da leitura à 540 nm para a realização dos cálculos de acordo com metodologia preconizada por Jorge *et al.* (2008).

2.8.3. Avaliação da Mutagenicidade.

A avaliação da mutagenicidade foi realizada usando a cepa da bactéria *E. coli* GM7330 com base na metodologia preconizada por Zdraveski *et al.* (1999), modificada. Para isso, foi inoculada uma suspensão da bactéria *E. coli* padronizada (10^3) em meio LB e 1 mL dessa suspensão foi incorporado em 25 mL de placas de Ágar MacConkey (Difco, suplementadas com 1% de lactose). As placas foram secas, e os poços foram perfurados com um objeto cilíndrico estéril. Em seguida, adicionou-se aos poços 30 µL dos efluentes I e II puros. Como controle positivo foi utilizado 10 µg de Ciprofloxacina. As placas foram então incubadas a 37°C e após 48 h foi avaliada a formação do halo, caso o efluente fosse mutagênico haveria a formação de um halo transparente em torno da colônia.

2.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados estatisticamente quanto às diferenças significativas, pelo teste de Log Rank, por meio da análise de variância (ANOVA) e por métodos estatísticos multivariados de análises de componentes principais (ACP) para

verificar a associação entre as variáveis. O nível de correlação existente entre os parâmetros testados foi avaliado de acordo com o Índice de Correlação de Spearman. O nível de significância de 95% foi considerado para que as medidas sejam significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXTRAÇÃO DE QUITINA E PRODUÇÃO DE QUITOSANA

A caracterização da matéria-prima (Resíduo sólido) utilizada para produção da quitosana, quanto a sua composição centesimal e umidade pode ser visualizada na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização do Resíduo Sólido proveniente da Carcinicultura.

| Resíduo | Nitrogênio | | | | |
|----------------|------------|----------|----------|-----------|---------|
| | Umidade | Cinzas | Lipídios | Proteína | Quitina |
| Camarão | 73,4±0,5 | 6,7±0,01 | - | 10,7±0,01 | 5,1±0,2 |

O resíduo demonstra um alto teor de proteína e carboidrato (quitina), mas não foram visualizados valores de gordura (lipídios) e o teor de minerais em forma de cinzas é compatível com os encontrados na literatura. Moura *et al.* (2006) descreveram a caracterização de resíduo de camarão e os resultados foram muito semelhantes ao descrito neste trabalho, com baixos teores de lipídeos, e alta concentração de compostos nitrogenados, o que também influencia na quantidade de compostos nitrogenados presentes no efluente. Neves *et al.* (2013) relatam a caracterização do resíduo de camarão. Os autores afirmam que encontraram teores de proteína e cinzas superiores ao encontrado no presente trabalho (42% e 15%), respectivamente.

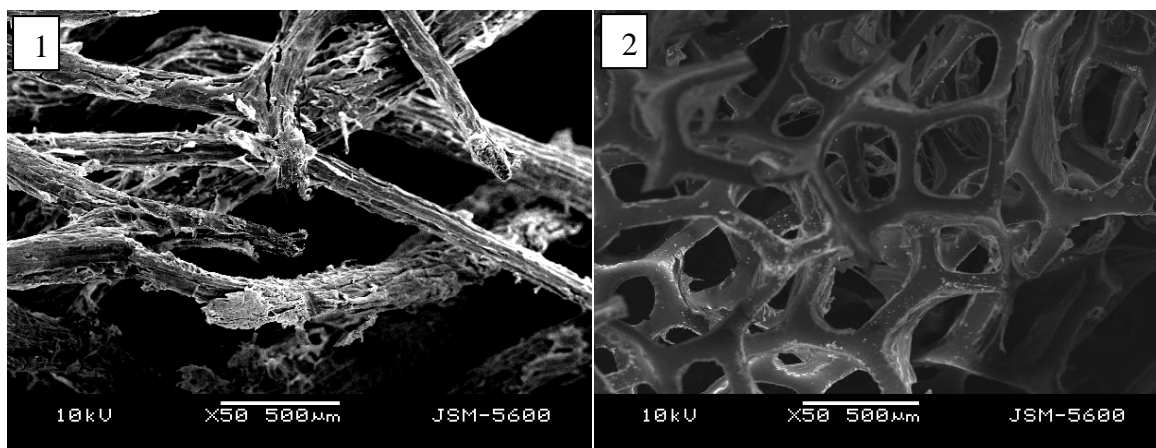
O processo para extração da quitina seguiu-se as etapas de pré-tratamento da matéria prima, desmineralização, desproteíntização, desodorização, despigmentação e secagem, conforme descrito no item 2.4.2 e por Assis e Brito (2008). No primeiro ensaio foram utilizados 280g da matéria prima inicial, dessa quantidade foram extraídos 42g de quitina, uma perda, durante os processos, de 85% da massa inicial.

O processo de produção da quitosana a partir da quitina seguiu a etapa de desacetilação, onde a quitina reage com solução de NaOH (42,3%) sob agitação e

aquecimento, etapa citada no item 2.4.3. Nesta etapa houve a conversão quase que total da quitina em quitosana com um rendimento próximo à 15% em relação a massa inicial. Um dos maiores problemas encontrados atualmente com a produção da quitosana é o seu rendimento em relação a massa inicial. A maioria dos trabalhos relata uma perda de mais de 80% de material em relação a massa inicial, atribuídos principalmente as etapas de desproteínização e desacetilação no processo de obtenção da quitina e conversão à quitosana. Moura *et al.* (2006) relataram em seu trabalho, um rendimento de 2,4 % de quitosana, muito inferior ao obtido neste trabalho utilizando a mesma espécie de camarão. Resultados similares também foram obtidos por Assis & Brito (2008), que obtiveram um rendimento de 20% de quitosana a partir da massa inicial contudo foram utilizados camarão de água doce do gênero *Macrobrachium* spp.

3.2 ENSAIOS MORFOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURAIIS: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Uma das ferramentas utilizadas para observação micromorfológica de estruturas porosas é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Neste sentido o perfil micromorfológico das quitosana pode ser observado nas Figuras 1 e 2.



Figuras 1 e 2 – Microestrutura da quitosana aumentada em 2500x.

Nas Figuras 1 e 2, podem-se observar as microestruturas da quitosana após extração e elaboração através da quitina. No MEV, podem-se visualizar as estruturas conservadas com os espaços (pits) entre as hastes de quitosana que formam a estrutura. Esses espaços são importantes no processo de imobilização, pois são a eles que os microrganismos irão se fixar através de ligações químicas fortes ou fracas, dependendo

do tipo de imobilização. Além dos pits, observa-se também uma estrutura opaca, bem organizada, formando uma rede característica de um compostos estruturante.

Souza *et al.* (2015) utilizou a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para caracterizar a quitina e a quitosana de casca de camarão proposta no trabalho. Os autores destacaram a conservação da estrutura após a extração da quitina e elaboração da quitosana, corroborando com o presente trabalho.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DO MICRORGANISMO EM QUITOSANA: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE QUITOSANASE.

De acordo com Moura *et al.* (2006) a quitosana é uma poliamina linear que possui grupamentos amino disponíveis para reações químicas, aos quais são atribuídas as propriedades de maior interesse. Tais grupamentos podem adquirir uma carga positiva em presença de soluções ácidas. Dai sua capacidade de solubilizar-se em ácidos orgânicos, o que constitui uma das principais características que diferencia a quitosana em relação a quitina. Em ensaios com microrganismos imobilizados em polímeros orgânicos é de extrema importância a verificação da resistência dos microrganismos a esse suporte, pois não é interessante que ocorra nenhum tipo de degradação do mesmo pelo agente biológico. Neste trabalho foi avaliada a resistência do *Lactobacillus plantarum* à quitosana e observou-se que não houve formação de halo, indicando que o organismo não possuía resistência ao polímero de interesse.

3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EFLUENTE.

Foi coletada amostra do efluente líquido proveniente de um empreendimento de carcinicultura com a finalidade de caracterizar o resíduo líquido quanto à sua composição e propriedades, foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: potencial hidrogeniônico (pH), condutividade, salinidade, turbidez, nitrato, nitrito, amônia, amônio, cloreto e TDS, os análises seguiram os procedimentos analíticos baseados no Standard Methods, AWWA APHA WEF (2005), os resultados encontrados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos e metais do efluente líquido.

| Parâmetros Físico - Químicos | Unidade | CONAMA 357/2005 | EFLUENTE I | EFLUENTE II |
|-------------------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------|--------------------|
| pH | | 6,5 – 9,0 | 7 | 9.9 |
| Condutividade | (μ S/cm) | *** | 36.4 | 35.7 |
| Salinidade | (%) | Superior a 0,5 e inferior a 30 | 21 | 20.08 |
| Turbidez | (UND) | *** | 17.9 | 37.71 |
| Nitrato | (mg/L) | 0,4 | 2.4 | 1.8 |
| Nitrito | (mg/L) | 0,07 | 1.06 | 0.08 |
| Amônia | (mg/L) | 0,4 | 1.4 | 2.0 |
| Amônio | (mg/L) | *** | 0.08 | 1.0 |
| Cloretos | (mg/L) | *** | 2,4 | 2.0 |
| TDS | (mg/L) | *** | 18.5 | 17.9 |
| Metais | Unidade | CONAMA 357/2005 | EFLUENTE I | EFLUENTE II |
| Co | (mg/L) | 1.0 | 0.361 | 0.309 |
| Cu | (mg/L) | 0.009 | 0.092 | 0.060 |
| Mn | (mg/L) | 0.1 | ≤ 100 | ≤ 100 |
| Pb | (mg/L) | 0.01 | 0,624 | 0.552 |
| Zn | (mg/L) | 5.0 | 0,160 | 0.083 |

*** Valores não disponíveis na resolução CONAMA n° 357/2005

Após a caracterização dos efluentes quanto aos seus parâmetros físicos e químicos, pode-se observar que os compostos nitrogenados nitrato, nitrito e amônia determinados pela legislação 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), estão acima dos valores estabelecidos pela Resolução. Pode-se destacar que os valores dos compostos estão até quinze vezes maiores que o determinado como aceitável pela legislação, como é o caso do nitrito. Este fenômeno é comum em efluentes de aquicultura devido à quantidade de amônia que é excretado pelos animais cultivados nos tanques. Esses compostos são frutos do metabolismo desses animais que precisam elimina-los para manter o equilíbrio corporal (homeostase). Quando ficam estáticos nos tanques de cultivo esses compostos sofrem influência do oxigênio dissolvido e da matéria orgânica sendo convertido a amônia em nitrato e nitrato em nitrito. De acordo com Tuna & Tagliolatto, (2015), a prática da carcinicultura afeta diretamente os ecossistemas costeiros, devido a sua implantação ser feita em ambientes estuarinos e seus efluentes, extremamente nitrogenados, serem descartados sem

tratamento no ambiente. Além das caracterizações físicas e químicas, foi avaliado também o teor de alguns metais presentes nos efluentes, e o que se pode observar é que entre todos os metais analisados, o cobre (Cu) com 0,092 mg/L e o chumbo (Pb) com 0,624 mg/L encontravam-se acima dos valores previstos pela legislação 357/05 do CONAMA para os efluentes dos dois pontos coletados.

Corroborando com este trabalho Chevakidagarn *et al.* (2017) avaliou vários efluentes de carcinicultura em um período de um ano (2012-2013), entre as análises realizadas estavam nitrogênio por Kjeldhal, cinzas e os metais chumbo e cobre. Os autores relataram que todos os valores estavam acima do permitido pela legislação vigente no país e que isso geraria um efluente e um sedimento extremamente tóxico.

3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EFLUENTE SEM TRATAMENTO (*IN NATURA*).

3.5.1 Toxicidade aguda

Os perfis de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* quando submetidas ao contato com os efluentes não tratados podem ser visualizados no Gráfico 1. Como podem ser observados, os resultados demonstraram que a taxa de sobrevivência das larvas frente ao efluente I foi de 0%, ou seja, nenhuma larva sobreviveu ao final dos dez dias de experimento, enquanto que o efluente II apresentou um percentual de sobrevivência de 60% das larvas ao logo do período.

A análise estatística pelo teste de Log Rank foi realizada para avaliar o nível de relação entre os efluentes quanto ao parâmetro toxicidade aguda. Após o ensaio de toxicidade do efluente *in natura*, foi constatado que existe uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o efluente I e II, com $p = 0.0251$, e também entre o efluente I e o controle PBS, com $p \leq 0.0001$. Associando esse dado com o quantitativo de sobrevivência das larvas pode-se concluir que apenas o efluente I apresentava toxicidade aguda que justificasse o tratamento.

Por esta razão o efluente I foi selecionado para dar continuidade no trabalho.

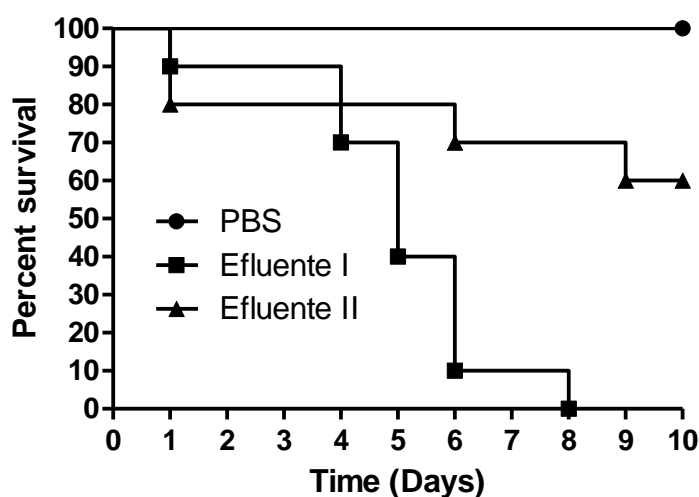


Gráfico 1 – Percentual de sobrevivência da larva *Tenebrio molitor* exposta ao efluente de carcinicultura sem tratamento

3.5.2 Citotoxicidade

Após a avaliação da citotoxicidade das células de fibroblastos frente ao efluente *in natura* (efluente I e II) utilizando a avaliação da viabilidade celular pela técnica de MTT, foi observado que, após 48h de exposição das células de fibroblasto aos efluentes I e II, houve uma perda de 77,2% e 74,9%, respectivamente, do total de células testadas, indicando uma toxicidade moderada dos efluentes, como pode ser visualizado no Gráfico 2.

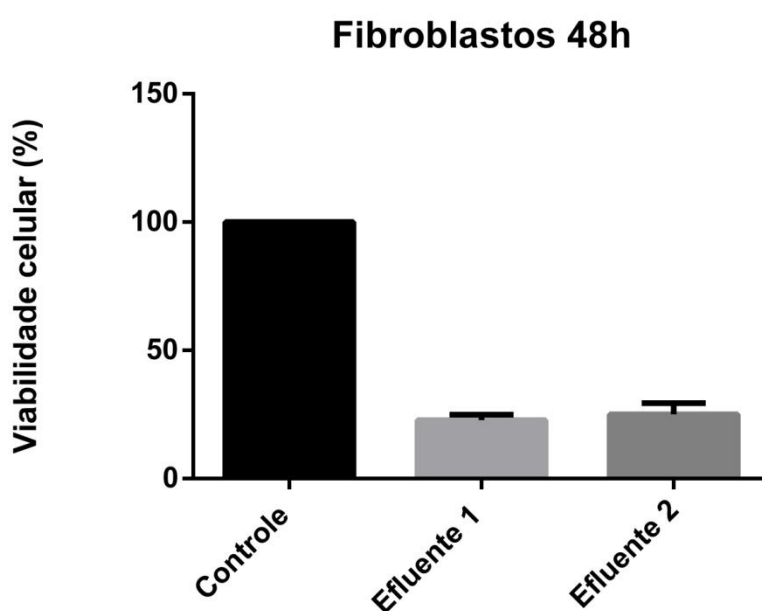


Gráfico 2 – Citotoxicidade dos efluentes de carcinicultura sem tratamento

3.5.3 Mutagenicidade

Após a exposição da bactéria modelo ao efluente, foi observado que o mesmo não possui potencial mutagênico nas condições preconizadas pelo teste, pois não foi observada a formação do halo em torno da colônia, como pode ser observado na Figura 3.

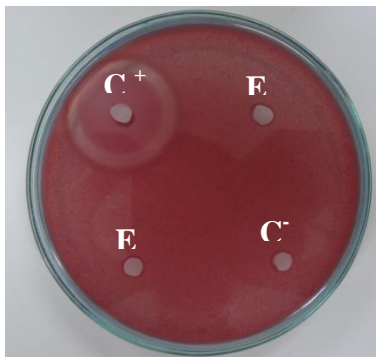


Figura 3 – Teste de mutagenicidade do efluente de carcinicultura sem tratamento, utilizando a bactéria *E. coli* GM 7330. (C⁺ - Controle positivo; E – efluente; C⁻ - Controle negativo).

Matos *et al.* (2011), testaram a mutagênica do Metabisulfito (SMB, Na₂S₂O₅), em efluente de carcinicultura no Estado do Piauí utilizando *Allium cepa* como modelo. O Metabisulfito é utilizado no efluente para evitar a proliferação de microrganismos danificando assim, a produção. Ao contrário deste trabalho, os autores relataram que o efluente de carcinicultura é mutagênico e atribuíram essa característica a presença de compostos tóxicos no efluente.

3.6 DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ATIVIDADE MICROBIANA

As melhores condições nutricionais e o processo otimizado foi estabelecido utilizando a metodologia de Planejamento Fatorial com elaboração do Gráfico de Superfície Resposta através do auxílio do Software Statistic 8.0.

Os melhores resultados obtidos para o micro-organismo livre podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 – Matriz do planejamento experimental e resultado após execução dos onze ensaios preconizados com o microrganismo livre.

| Ensaio | Variáveis independentes | | | | Variáveis dependentes | | | |
|-----------------------------|-------------------------|---------|-------------------|------------------|-----------------------|---------------|-------------------|-------------------|
| | Valores codificados | | Valores reais | | Micro-organismo livre | | | |
| | Agitação | Inóculo | Agitação (RPM) | Inóculo (UFC) | DBO (mg/l) | DQO (mg/l) | Nitrato (mg/l) | Nitrito (mg/l) |
| 1 | -1 | -1 | 26 | 0,3 | 214,88 | 265,44 | 1,9 | 0,20 |
| 2 | +1 | -1 | 154 | 0,3 | 450 | 9951,2 | 2,2 | 0,22 |
| 3 | -1 | +1 | 26 | 0,7 | 1170 | 1220,5 | 3,6 | 0,31 |
| 4 | +1 | +1 | 154 | 0,7 | 10200 | 24793 | 24,5 | 0,37 |
| 5 | -1,41 | 0 | 0 | 0,5 | 600 | 4437,32 | 1,7 | 0,17 |
| 6 | +1,41 | 0 | 180 | 0,5 | 1158,5 | 7559 | 7,9 | 0,19 |
| 7 | 0 | -1,41 | 90 | 0 | 4,5 | 69,22 | 0,6 | 0,15 |
| 8 | 0 | +1,41 | 90 | 1,0 | 810 | 1439,17 | 7,1 | 0,22 |
| 9 | 0 | 0 | 90 | 0,5 | 525 | 630 | 30 | 0,74 |
| 10 | 0 | 0 | 90 | 0,5 | 615 | 649,1 | 30 | 1,15 |
| 11 | 0 | 0 | 90 | 0,5 | 700 | 18479 | 18,4 | 0,63 |
| Efluente não tratado | | | | | 64,6 | 783,8 | 2,4 | 1,06 |
| CONAMA 357/2005 | | | | | ≤ 50 | ≤ 150 | 0,4 | 0,07 |

De acordo com relatos na literatura, o problema da aquicultura é a geração de efluentes nitrogenados que serão lançados sem tratamento no ambiente, principalmente em áreas estuarinas onde encontram-se o ecossistema manguezal. Esses locais são os preferidos para a implementação das fazendas de criação, de peixe (psicultura), ostra (ostreicultura) e camarão (carcinicultura).

A preocupação com a demanda e o descarte desses efluentes de carcinicultura já existe há décadas. De acordo com Marinho-Soriano (2007), a maioria das fazendas de cultivo de camarão estão localizadas em ambientes estuarinos e manguezais, o que contribui para o aumento dos processos de eutrofização e desequilíbrio ecológico na área de costa. Devido a essa problemática é importante estabelecer tratamentos simples e de baixo custo que possibilite o descarte de um efluente menos tóxico.

O planejamento experimental é uma metodologia estatística que tem como principal objetivo a confiabilidade dos resultados com uma quantidade mínima de experimentos que garanta o grau de liberdade. Neste trabalho pode se observar que o Ensaio 7 do planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), apresentou os menores valores em relação às demais condições

testadas. Após cinco dias de experimento nas condições de 0 de inóculo e agitação de 90 rpm obteve-se 4.5 mg/L de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), 69.22 mg/L de Demanda Química de Oxigênio, 0.6 mg/L de Nitrato, e 0,15 mg/L de nitrito. Os demais experimentos apresentaram resultados desfavoráveis, muito acima do que é estabelecido pela resolução CONAMA 357/05, como pode ser observado na Tabela 4.

Nesse sentido, após a realização dos ensaios preconizados no planejamento experimental pode-se observar que o aumento da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) é diretamente proporcional ao aumento do inóculo. Pode-se entender esse fenômeno, pois como a DBO está diretamente relacionada a atividade metabólica dos organismos presentes no efluente, é de se esperar que ao aumentar a carga microbiana a atividade metabólica também aumente. Quando o parâmetro avaliado é a Demanda Química de Oxigênio (DQO) pode-se observar que o aumento do valores está relacionado com a velocidade de agitação. O que pode ser explicado pela geração de Oxigênio livre quando ocorre uma agitação homogenia e uniforme por um período de tempo constante. Muito provavelmente as reações químicas dentro do frasco são intensificadas em uma determinada faixa de agitação.

Em relação aos compostos nitrogenados avaliados, pode-se observar que ambos se encontram com valores alterados, muito acima do determinado pela legislação 357/2005 do CONAMA. Embora os valores de nitrato estejam muito superiores aos de nitrito, este último é bem mais tóxico do que o primeiro devido ao seu estado de oxidação, bem mais disponível para peixes e crustáceos, conseqüentemente mais tóxico. Entretanto com os valores dos compostos nitrogenados alterados, a probabilidade do crescimento de algas é grande, causando assim processos de eutrofização e geração de substâncias tóxicas no ambiente aquático.

Dentre todos os ensaios realizados pode-se observar que quando não se adiciona o inóculo e a agitação é moderada (90 rpm), os níveis de DBO e DQO caem para os limites preconizados pela legislação CONAMA, e os compostos nitrogenados, embora ainda fora da faixa de valores aceitável, já se encontra bem mais baixa e próximo aos preconizados pela legislação. Segundo Braile e Cavalcanti (1993), considera-se um efluente facilmente biodegradável aquele que a razão $DQO/DBO_5 \leq 2$. No caso do efluente tratado no trabalho a razão DQO/DBO_5 é igual a 12,2 sugerindo não ser um efluente biodegradável, o que justificaria um tratamento apenas com aeração estimulando as reações físico-químicas e biológicas próprias do efluente.

Em contrapartida aos resultados encontrados neste trabalho, diversos autores preconizam tratamentos biológicos utilizando de técnicas de biorremediação. Su *et al.* (2011), propuseram o tratamento de efluente de carcinicultura adicionando ao tanque de estocagem três espécies de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformis*). Com isso, os autores observaram que a utilização da policultura ajuda a reduzir o resíduo presente no efluente, tornando-o menos tóxico. Os autores propõem também uma co-cultura de camarão com ostra, relatando que este método facilita a remoção da matéria orgânica remanescente no efluente.

Corroborando com este trabalho, Marinho-Soriano *et al.* (2009), utilizaram macroalgas na tentativa de diminuir os compostos nitrogenados e a matéria orgânica. Os autores relataram que a “cama de algas” montada no próprio tanque de criação tem a capacidade de se utilizar do nitrogênio e fósforo presentes no efluente e com isso aumentar a quantidade das algas. Com isso, os autores afirmaram que o cultivo de algas junto com o camarão pode ser uma alternativa à utilização de microrganismos eficiente para a remoção de nutrientes tóxicos presentes no efluente.

Corroborando com este trabalho, Martins *et al.* (2017), propuseram um tratamento de efluente oriundo de cultivo de ostra, os autores relatam que os teores de compostos nitrogenados e fosforados estão acima da legislação local, e propõem um reator utilizando o resíduo de ostra (casca) para a remoção desses compostos ao invés da utilização de microrganismos que aumentaria o teor de matéria orgânica.

Embora vários autores tenham proposto a utilização do processo de biorremediação, neste caso, pode-se observar uma maior eficiência do processo quando não se pratica a bioaugmentação. Essa prática é favorável do ponto de vista econômico, pois preconiza um tratamento que só demanda a aeração do tanque, sem adição de nenhum outro nutriente e nem microrganismo.

3.6.1 Análise de Componentes Principais

Os tratamentos preconizados pela metodologia de planejamento experimental foram relacionados através da metodologia estatística multivariada de Análise de Componente Principais (ACP) como pode ser visualizado na Figura 4. O ACP é um procedimento matemático que utiliza uma transformação ortogonal (ortogonalização de vetores) para converter um conjunto de observações de variáveis possivelmente correlacionadas num conjunto de valores de variáveis linearmente não

correlacionadas chamadas de componentes principais. Esta análise é importante para estabelecer dentro de um conjunto de dados aqueles que se relacionam com o tratamento proposto.

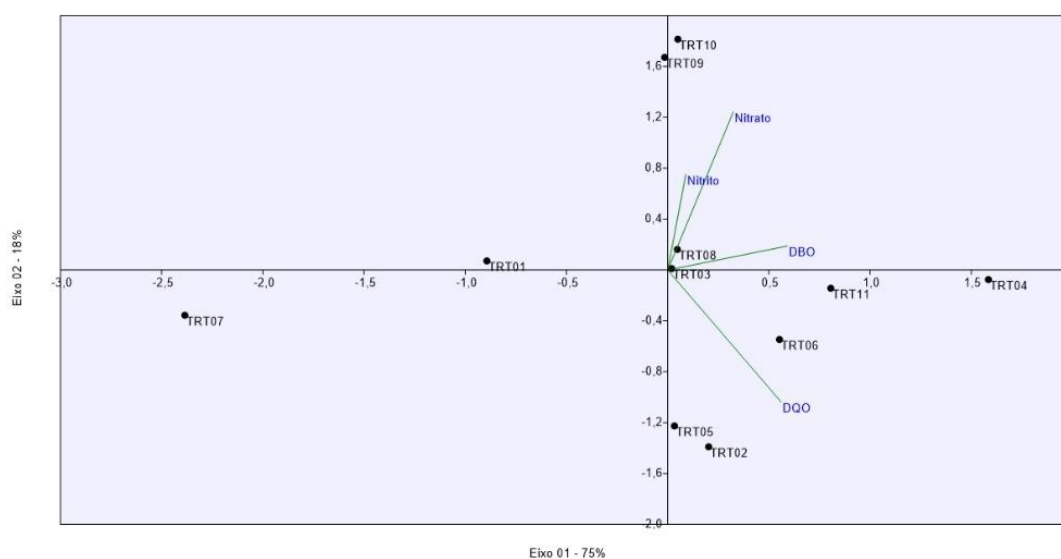


Figura 4 – Análises de Componentes Principais utilizados no tratamento de efluente de carcinicultura.

Na Figura 4, pode-se observar que os tratamentos 02 e 05 foram considerados similares, bem como os tratamentos 03, 08, 09 e 10. Já os tratamentos 01, 04, 07 e 11 foram considerados diferentes entre si e entres os outros tratamentos. O eixo 1, que explica 77% das variações, enquanto o eixo 2 explica 18% das variações.

O DBO (0,67) e DQO (0,63) foram mais correlacionados ao EIXO 1 enquanto que o nitrito (0,41) e nitrato (0,69) foram mais relacionados ao eixo 2. Pode-se observar na Figura 4 que o tratamento 07 não se correlaciona com nenhum outro tratamento e como os valores da suas variáveis resposta foram os mais baixos de todo os tratamentos preconizados, ele foi selecionado para a realização da cinética.

3.6.2 Metodologia de Superfície Resposta

A metodologia de superfície de resposta denominada em inglês por RSM (Response Surface Methodology) é um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para desenvolver, melhorar e otimizar uma resposta de interesse, que é influenciada por diversas variáveis dentro de um processo de medição e análise

experimental (MYERS *et al*, 2009). A fim de determinar as condições ótimas no processo de tratamento foi estabelecido o modelo predito para as variáveis nitrato e nitrito que apresentaram termos estatisticamente significativos, os quais podem ser visualizados nos modelos 1 e 2:

$$\text{nitrato} = 25.14 - 22.72^2 \text{agitação} - 7.04^2 \text{inóculo} \quad \text{modelo 1}$$

$$\text{nitrito} = 0.80 - 0.70^2 \text{agitação} - 0.20^2 \text{inóculo} \quad \text{modelo 2}$$

A partir dos modelos, foram gerados os gráficos superfície de resposta das variáveis nitrato e nitrito onde pode-se visualizar a tendência para os valores ótimos de tratamento do efluente. Quando se considera as variáveis respostas nitrato e nitrito, a tendência pode ser visualizada nos Gráficos 3 e 4. Pode-se observar que existe uma região com enorme concentração desses dois parâmetros, que são as áreas em vermelho escuro, e uma região de baixa concentração, que são as áreas vermelho claro. Pode-se verificar a existência de uma região ótima para baixos valores de nitrato e nitrito onde se encontra uma faixa em formato de anel na tonalidade vermelho claro, região próxima de 0 (zero). Quando se observa a Tabela 4 de resultados do planejamento experimental após todos os experimentos efetuados, conclui-se que os melhores valores de nitrato e nitrito estão na condição 7, onde se tem o efluente tratado em condição abiótica com incubação sob agitação de 90 rpm, valores encontrados na região do gráfico.

O planejamento experimental é uma metodologia estatística amplamente utilizada para otimizar as condições em vários tipos de processos biotecnológicos. Miranda *et al.* (2012), estabeleceu as condições de tratamento de efluente gerado por lavanderia têxtil utilizando planejamento estatístico do tipo DCCR com quatro variáveis independentes. Corroborando com este trabalho os autores também obtiveram a agitação como uma das variáveis interferente no processo de tratamento do efluente têxtil por fungos filamentosos.

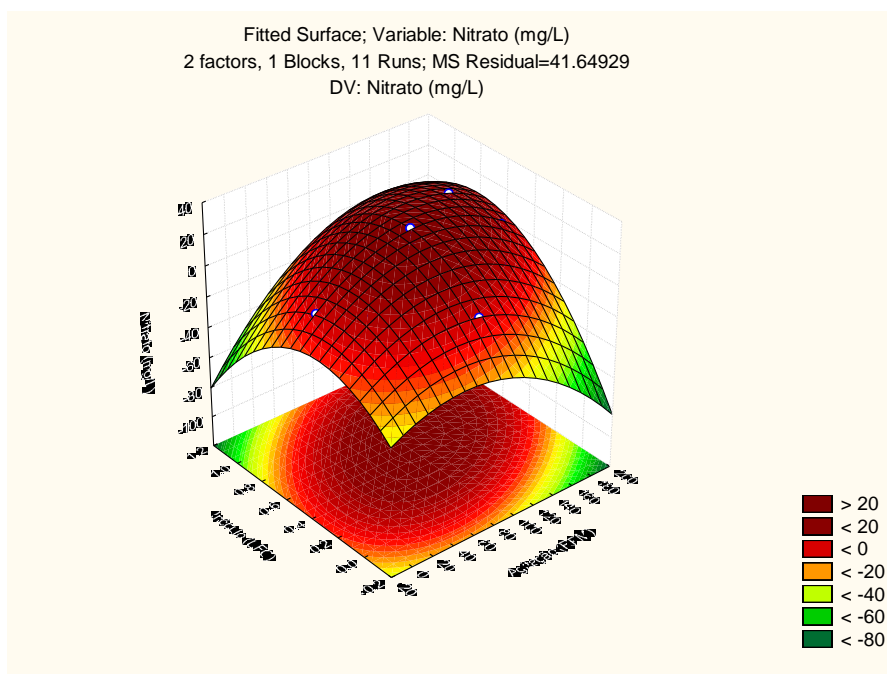


Gráfico 3 – Superfície de resposta: Nitrato em função das variáveis agitação e inóculo.

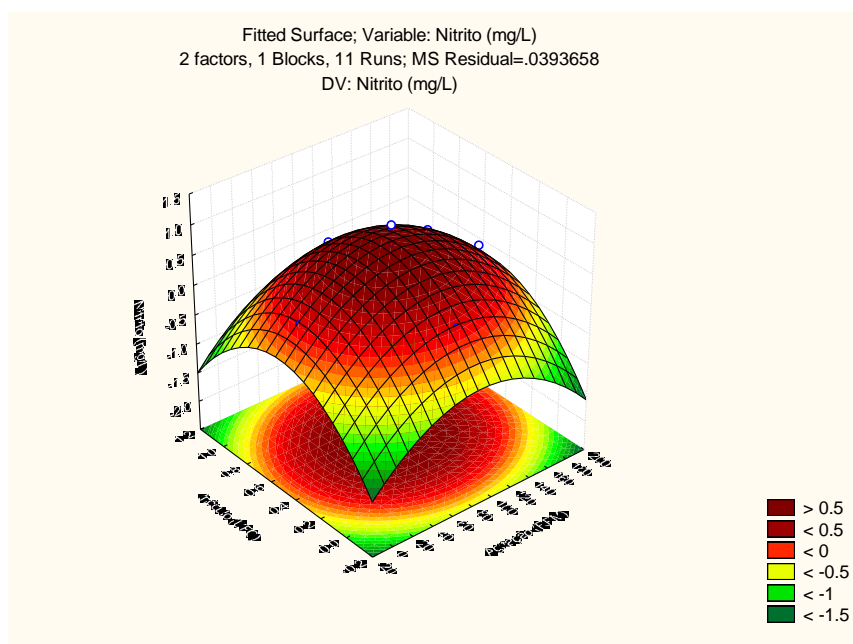


Gráfico 4 – Superfície de resposta: Nitrito em função das variáveis agitação e inóculo.

3.6.3 Cinética de Tratamento com as Condições Otimizadas e o *Lactobacillus plantarum* imobilizado.

Com as condições de tratamento estabelecidas pela metodologia estatística de planejamento experimental foi realizada a cinética de tratamento com a condição otimizada durante cinco dias. Com o objetivo de verificar se o *Lactobacillus plantarum*

realmente não melhoraria a toxicidade do efluente foi realizada uma cinética de tratamento com a bactéria imobilizada em quitosana. O perfil cinético de ambos os tratamentos pode ser visualizado no Gráfico 5.

Os perfis cinéticos de tratamento do efluente foram bem semelhantes porém demonstraram diferenças importantes nos valores dos compostos nitrogenados e no tempo de tratamento. Pode-se observar que a condição abiótica, ou seja, sem a adição de microrganismos (bioaugmentação) é a mais eficaz para diminuir a concentração de compostos nitrogenados tóxicos no efluente. A condição abiótica demonstra que os menores valores de nitrito (0.10 mg/L) são obtidos no terceiro dia de processo, enquanto que o menor valor de concentração de nitrato (0.6 mg/L) é no quinto dia. Já no tratamento onde se utiliza o *Lactobacillus plantarum* imobilizado com quitosana se observa que o melhor tempo de tratamento continua sendo o terceiro dia, com valores de nitrito 0.17 mg/L e de nitrato 6.9 mg/L. O nitrato e o nitrito são, juntamente com a amônia, os compostos nitrogenados que geram os maiores teores de toxicidade no efluente de aquacultura. Outro fenômeno observado quando o tratamento foi realizado com bioaugmentação são os valores da Demanda Química de Oxigênio e Demanda Bioquímica de Oxigênio. Quando se trata do oxigênio demandado biologicamente (DBO) o que se observa é um aumento de 64.6 mg/L para 700 mg/L se mantendo até 48h. A partir das 72h observa-se uma diminuição dessa demanda para 35mg/L indicando uma menor atividade biológica neste tempo. Entretanto os valores de DBO voltam a aumentar e no final do tratamento estão em 105 mg/L. Esse perfil pode indicar que houve uma diminuição da atividade microbiana presente no efluente até o terceiro dia, o que pode estar associado a diminuição dos valores de nitrato e nitrito. Uma adaptação as novas condições do efluente permitiram que a DBO voltasse a aumentar indicando um aumento na atividade biológica endógena. Já quando a atividade é oxidativa (DQO) o que se observa são valores partindo de 738 mg/L no T0 e aumentando para 6000 mg/L com 48h, no terceiro dia diminui para 1050 mg/L voltando a ter um discreto aumento no quinto dia, chegando a 1393 mg/L. Como os perfis de DBO e DQO foram semelhantes, acredita-se que existe uma relação direta entre a demanda de oxigênio química e biológica tendo uma relação direta dos compostos produzidos por reações metabólicas ou oxidativas livres.

De um modo geral, a nitrificação é um processo biológico, portanto presume a ação de seres vivos, levada a cabo por bactérias especiais, mas que ocorrem naturalmente em sistemas onde existam condições aeróbias e a presença de nitrogênio

amoniacal. Embora a rota de degradação dos compostos nitrogenados já seja estabelecida, alguns autores também defendem que a acidificação do meio contribui para a diminuição desses compostos pois estimula a ação de fungos presentes na microbiota endógena. Os ácidos lácticos, acético, succínico e oxálico contribuem para o aumento da microbiota endógena e a liberação de enzimas que ajudam no processo de tratamento do efluente.

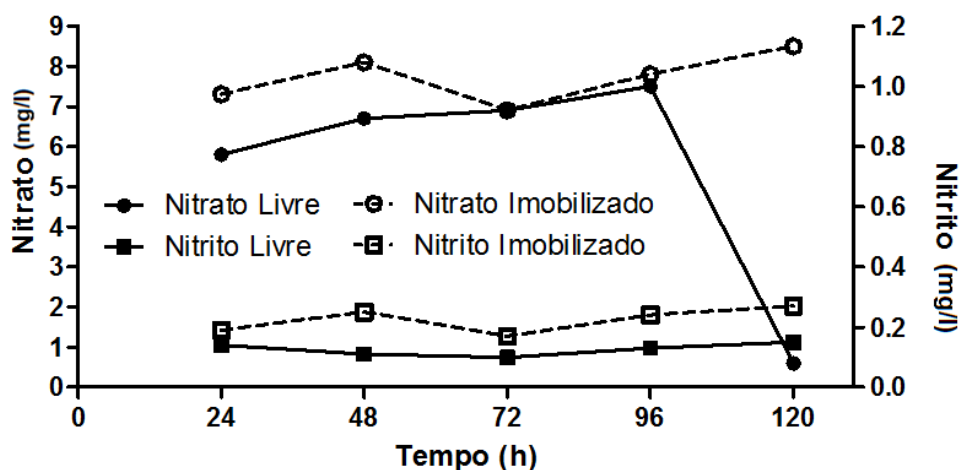


Gráfico 5 – Perfil cinético do tratamento do efluente em condições abióticas e com *Lactobacillus plantarum* imobilizado em quitosana.

Embora pareça bastante simples, este processo precisa ocorrer sob condições controladas, caso contrário os próprios produtos do metabolismo destas bactérias causarão aumento de toxidez no meio o que é muito nocivo para as mesmas. Em resumo este processo biológico consiste na oxidação de amônia para nitratos, com formação intermediária de nitritos. Com a realização da cinética pode-se concluir que dentro de um sistema fechado é possível diminuir, à valores aceitáveis pela legislação, os teores de compostos nitrogenados, diminuindo assim a toxicidade dos mesmos. Levando em consideração que o camarão é cultivado em tanques com tamanho e profundidade conhecidas é possível estabelecer um tratamento, como a lagoa aerada, para ser implementada nesses tanques e com isso o descarte do efluente no ambiente ser realizado de forma mais segura.

Com as cinéticas de tratamento é possível visualizar os melhores tempos de tratamento, Miranda *et al.* (2013) estabeleceu o melhor tempo de degradação de efluente têxtil utilizando fungos filamentosos através da cinética de degradação dos corantes, principal constituinte desses efluentes. Os autores afirmaram que o efluente têxtil

degrada a condições aceitáveis após dez dias de tratamento. É comum a utilização de bioaugmentação para tratar alguns tipos de efluentes. Garcia *et al* (2017) utilizaram *Lactobacillus brevis* para acidificar o meio e aumentar e estimular a população fúngica do tanque de cultivo de camarão. Os autores afirmaram que a acidificação do meio através da produção dos principais ácidos orgânicos estimulou o crescimento do fungo *Rhizopus oligosporus* e com isso ocorreu a diminuição de compostos tóxicos pela liberação das enzimas do metabolismo fúngico. Nem sempre a bioaugmentação é realizada com bactérias, Marques *et al.* (2017) adicionaram uma espécie de poliqueta (*Hediste diversicolor*) em um tanque de aquacultura para tentar diminuir o teor de matéria orgânica e com isso conseguir cultivar espécies de hortaliças hidropônicas. Os autores relataram que o poliqueta auxiliou na diminuição do nitrogênio livre presente no tanque e conseqüentemente diminuiu o teor de matéria orgânica. Os autores denominaram essa associação de biomitigação e sugeriram essa prática para efluentes muito salinos e com teor de matéria orgânica elevado, gerados por espécies específicas de bactérias halotolerantes que se desenvolvem em tanques de criação de peixe de água salgada.

3.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EFLUENTE COM TRATAMENTO

À amostra do efluente tratado, que foi submetido novamente à avaliação de toxicidade (toxicidade aguda e citotoxicidade), refere-se à amostra submetida às 72h de tratamento, pois esse tratamento apresentou o nível mais baixo de nitrito, composto nitrogenado mais tóxico no meio aquático.

3.7.1 Toxicidade Aguda

Para avaliação da toxicidade aguda do efluente tratado foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 2.9.1, e o resultado, quanto ao perfil de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* quando submetidas ao contato com o efluente tratado, pode ser visualizado no Gráfico 6.

Como pode ser observado, o resultado demonstrou que a taxa de sobrevivência das larvas frente ao efluente tratado foi de 90%, com média de 9 (nove) dias para uma única larva não mais responder aos estímulos.

Pela análise estatística de Log Rank realizada, pode ser observado que, ao contrário do efluente *in natura*, o efluente tratado não apresentou diferença estatística

significativa ($p < 0,05$) em ralação ao controle PBS, $p = 0.3173$. Levando-se em conta os aspectos observados, entende-se que o efluente submetido ao tratamento deixou de apresentar a toxicidade aguda que antes tinha sido detectada pelo efluente *in natura*.

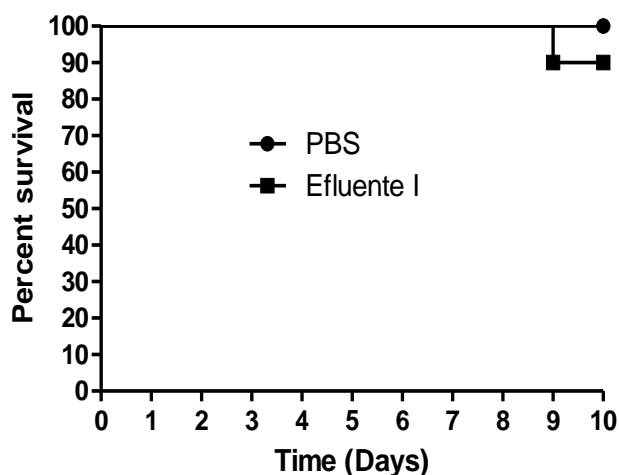


Gráfico 6 – Percentual de sobrevivência da larva *Tenebrio molitor* exposta ao efluente de carcinicultura com tratamento.

Não existe um modelo ideal para avaliação da toxicidade dos efluentes, cada autor pode escolher o método que melhor retrata seus resultados, porém é necessário que os testes de toxicidade sejam realistas e retratem o quanto o efluente é tóxico. Corroborando com este trabalho, Castañeda *et al.* (2017), testaram a toxicidade aguda de efluente de carcinicultura em espécies de camarão utilizando quatro tipos de tratamentos diferentes no tanque de armazenamento do efluente rico em compostos nitrogenados. Os autores relataram que o tratamento que apresentou uma menor LC50 (Lethal Concentration) foi a que havia uma alimentação e renovação do tanque.

3.7.2 Citotoxicidade

Após a avaliação da citotoxicidade das células de fibroblastos frente ao efluente tratado utilizando a avaliação da viabilidade celular pela técnica de MTT, observou-se um aumento no percentual de células viáveis, 86,5%, ou seja, uma perda de apenas 13,5% de célula, constatando a diminuição da citotoxicidade do efluente após o tratamento como pode ser visualizado no Gráfico 7.

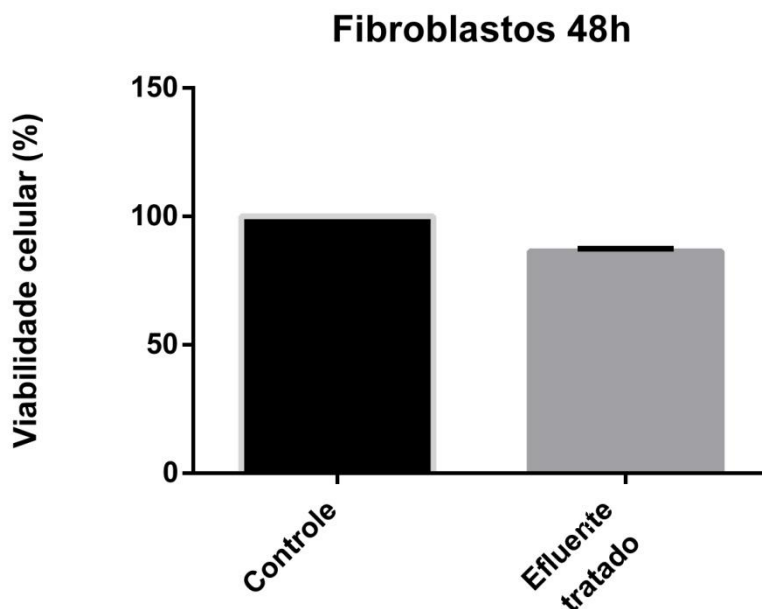


Gráfico 7 – Citotoxicidade do efluentes de carcinicultura com tratamento.

A diminuição da toxicidade em dois dos testes de ecotoxicidade utilizados neste trabalho demonstra a importância da associação desses testes com o processo de tratamento. Este fenômeno pode estar associado a diminuição dos teores de nitrito a níveis determinados pela legislação, já que é sabido o potencial tóxico dos compostos nitrogenados e sua diminuição torna o ambiente mais aceitável para a vida. Um outra observação relevante é que mesmo com os valores de nitrato, DBO e DQO ainda um pouco acima dos determinados pela legislação, a toxicidade aguda do efluente diminuiu demonstrando com isso que o nitrito é um dos principais agentes tóxicos de efluentes da aquicultura.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos observa-se que embora o efluente de carcinicultura esteja, com os níveis de metais, matéria orgânica e compostos nitrogenados acima dos preconizados pela legislação, é possível tratar o efluente reduzindo os níveis de DBO, DQO, nitrato e nitrito para níveis aceitáveis pela legislação apenas aerando o tanque de armazenamento. Esse tratamento foi suficiente para demonstrar a diminuição da toxicidade do efluente que quando não tratado demonstrou toxicidade aguda e citotoxicidade, e quando submetido ao tratamento com as condições preconizadas pelo planejamento experimental, não mostrou mais toxicidade nos modelos utilizados. O tratamento estabelecido neste trabalho preconiza apenas a aeração o que torna o processo barato e acessível para qualquer carcinicultor que deseja realizar essa prática como fonte de renda.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **Levantamento da Infraestrutura Produtiva e dos Aspectos Tecnológicos, Econômicos, Sociais e Ambientais da Carcinicultura Marinha no Brasil em 2011.** *Revista da ABCC, Rio Grande do Norte*, [s.n], abr. 2013.

ALAM, S. M. Nazmul *et al.* **Compliance of Bangladesh shrimp culture with FAO code of conduct for responsible fisheries: a development challenge.** *Ocean & Coastal Management*, v. 48, n. 2, p. 177-188, 2005.

APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation) **Standard Methods for the examination of Water and Wastewater**, 21a ed., Washington, D.C. 2005.

ASSIS, O. B. G; BRITO, D. **Processo básico de extração de quitinas e produção de quitosana a partir de resíduos da carcinicultura.** *Revista Brasileira de Agrociências*, Pelotas, vol.14, nº1, p. 91-100, jan/mar. 2008.

BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A., **Manual de Tratamento de Águas Residuárias.** São Paulo, Cetesb, 764p, 1993.

BRASIL – Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). 2011- **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil 2008-2009.** Disponível em: [http://www.mpa.gov.br/images/ Docs/Publicidade/anuário da pesca completo2.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/anuário_da_pesca_completo2.pdf)

BRASIL – Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA. 2013. **Censo Aquícola Nacional.** Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Censo_maio2013-2.pdf.

CASTAÑEDA, Gladys Valencia *et al.* **Comparison of four treatments to evaluate acute toxicity of nitrite in shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae: Influence of feeding and the renewal water.** *Aquaculture*, 2017.

CASTRO, Alessandra Almeida; PAGANI, German Dario. **Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas.** *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 6, n. 2, p. 123-129, 2004.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 312, de 10 de outubro de 2012. **Dispõe sobre o licenciamento ambiental dos empreendimentos de carcinicultura na zona costeira.** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res02/res31202.html>. Acesso em: 14 de dezembro de 2016.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as**

condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em 14 de dezembro de 2016.

CHEVAKIDAGARN, Panalee *et al.* **Environmental impact of white shrimp culture during 2012–2013 at Bandon Bay, Surat Thani Province: A case study investigating farm size.** *Agriculture and Natural Resources*, v. 51, n. 2, p. 109-116, 2017.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Yearbook of fishery statistics: summary tables.** FAO, Roma, 2009.

FREITAS, Rodrigo Randaw *et al.* **Maricultura e Meio Ambiente.** *Revista Brasileira de Agroecologia*, Rio Grande do Sul, vol.4, nº3, p. 107-113, mai. 2009.

GARCIA, A.R., GUERRERO, A.R., IFUKU, S., SHIRAI, K., **Successive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp wastes for recovery of chitin and added-value products.** *Process Biochemistry*, v. 58, p. 17-24.

JORGE, Michelle Pedroza *et al.* **Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 118, n. 3, p. 361-366, 2008.

MARINHO-SORIANO, E., 2007. **Seaweed biofilters: an environmentally friendly solution.** *World Aquac.* 38, 31–71.

MARINHO-SORIANO, E. *et al.* **Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater.** *Bioresource Technology*, v. 100, n. 24, p. 6192-6198, 2009.

MARQUES, B., CALADO, R., LILLEBO, A.I., **New species for the biomitigation of a super-intensive marine fish farm effluent: Combined use of polychaete-assisted sand filters and halophyte aquaponics.** *Science of the Total Environment*, v. 599, pp. 1922-1928.

MARTINS, Marta C.; SANTOS, Eduarda BH; MARQUES, Catarina R. **First study on oyster-shell-based phosphorous removal in saltwater—A proxy to effluent bioremediation of marine aquaculture.** *Science of The Total Environment*, v. 574, p. 605-615, 2017.

MATOS, Ivana Mara da Costa Machado *et al.* **Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil.** *Chemosphere*, v. 82, n. 7, p. 1056-1061, 2011.

MEIRELES, A. J de A.; QUEIROZ, Luciana. **A monocultura do camarão: danos socioambientais à base da vida comunitária tradicional no litoral do Nordeste brasileiro.** *Desenvolvimento e Conflitos Ambientais*, p. 224-249, 2010.

MIRANDA, R.C.M, GOMES, E.B.G, GOUVEIA, E.R., MACHADO, GUSMÃO, N.B., **Decolorization of laundry effluent by filamentous fungi**, African Journal of Biotechnology, v 11(18), pp. 4216-4224, 2012.

MIRANDA, R.C.M, GOMES, E.B.G, PEREIRA JR, N., MARIN-MORALES, M.A., MACHADO, GUSMÃO, N.B., **Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181**. *Bioresource Technology*, v 142, pp. 361-367, 2013.

MOURA, Catarina *et al.* **Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto**. *Vetor – Revista de Ciências Exatas e Engenharias*, Rio Grande do Sul, nº16, p. 37-45, 2006.

MYERS, Raymond. H. *et al.* **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments**. *John Wiley & Sons*, cap.1, USA, pp. 1-13, 2009.

NATORI, M. N. *et al.* **Desenvolvimento da Carcinicultura Marinha no Brasil e no Mundo: avanços tecnológicos e desafios**. *Informações Econômicas*, v. 41, p. 61-73, 2011.

NEVES, Andressa Caroline *et al.* **Otimização de processos de obtenção de quitosana a partir de resíduo da carcinicultura para aplicações ambientais**. *Revista Brasileira de Energia Renováveis*, [s.l], Vol. 2, p. 34-47, 2013.

NÓBREGA, G. N. *et al.* **Iron and sulfur geochemistry in semi-arid mangrove soils (Ceará, Brazil) in relation to seasonal changes and shrimp farming effluents**. *Environmental monitoring and assessment*, v. 185, n. 9, p. 7393-7407, 2013.

NOMEN, Rosa *et al.* **Measurement of pollution levels of organochlorine and organophosphorus pesticides in water, soil, sediment, and shrimp to identify possible impacts on shrimp production at Jiquilisco Bay**. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 8, p. 3547-3555, 2012.

OLIVEIRA, E. G.; SANTOS, F. J. S. **Conservação e uso racional de água: Integração aquicultura-agricultura**. In: MEDEIROS, S. S. *et al.* (Eds.). *Recursos hídricos em regiões áridas e semiáridas*. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2011. p. 113–161.

PAUL, Brojo Gopal; VOGL, Christian Reinhard. **Impacts of shrimp farming in Bangladesh: challenges and alternatives**. *Ocean & Coastal Management*, v. 54, n. 3, p. 201-211, 2011.

POERSCH, L.H.S. **Aquacultura no estuário da Lagoa dos Patos e sua influência sobre o meio ambiente**. 2004. 146p. Tese Doutorado - Fundação Universidade Rio Grande Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

QUAGLIA, L.J.C. **Estudo da qualidade da água do canal de Taperoá (Valença-Ba): Implicações na carciniculturamarinha**. 1993. 118p. Tese de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

QUEIROZ, L. *et al.* **Shrimp aquaculture in the federal state of Ceará, 1970–2012: Trends after mangrove forest privatization in Brazil.** *Ocean & Coastal Management*, v. 73, p. 54–62, 2013.

ROCHA, Itamar P.; RODRIGUES, J. A. **Carcinicultura brasileira.** *Revista da ABCC*, v. 5, p. 30-45, 2003.

ROCHA, Itamar P. **Cultivo do Camarão Marinho: Realidade e verdades sobre a sua Sustentabilidade Ambiental e Contribuições para a Socioeconomia das Regiões e sua Intervenção.** *Revista da ABCC*, Rio Grande do Norte, Edição Especial, ago. 2015.

SOARES, N. M. *et al.* **Obtenção e purificação de quitosana a partir de resíduos de camarão em escala piloto.** *Revista Univap*, São José dos Campos-SP, v. 10, n. 18, p. 88-92, 2003.

SOUZA, F. M., FERREIRA, F. M. S., BARBOSA, R.C., **Utilização da Casa de Camarão para a Produção da Quitina.** *Scienc. 07* (1), 1-11, 2015.

SMITH, D. M. *et al.* **The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).** *Aquaculture*, v. 207, n. 1, p. 125-136, 2002.

SU, Yuepeng; MA, Shen; LEI, Jilin. **Assessment of pollutant reducing effect by polyculture and bioremediation in sediment of marine shrimp ponds.** *Procedia Environmental Sciences*, v. 10, p. 1559-1567, 2011.

TUNA, Fernando Augusto Pereira; TAGLIOLATTO, Alícia Bertoloto. **Um Breve panorama abordando aspectos positivos e negativos da maricultura.** *Revista Inovação, projetos e Tecnologias-IPTEC*, São Paulo, vol.3, nº3, p. 127-136, jan/jul. 2015.

ZDRAVESKI, Zoran Z. *et al.* **Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin.** *Chemistry & biology*, v. 7, n. 1, p. 39-50, 2000.